

Die Wirkung wässriger Auszüge
aus Herbstlaub auf das Gedeihen von
Azotobacter Chroococcum und *Agile*

von

DIETER SÄURIG

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555208_0060

DIE WIRKUNG WÄSSRIGER AUSZÜGE AUS HERBSTLAUB AUF DAS

GEDEIHEN VON AZOTOBACTER CHROOCOCCUM UND AGILE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Dieter Säurig

aus

München

Januar 1961



Berichterstatter: Prof. Dr. F. Bukatsch

Prof. Dr. L. Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 1961

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Die Wirkung wäßriger Auszüge aus Herbstlaub auf das Gedeihen von Azotobacter chroococcum und agile

Übersicht:	Seite
I. Einleitung	1 - 3
II. Arbeitsweise	
1. Auswahl und Lagerung des Materials	4
2. Auswahl und Pflege der Kulturen	4
3. Isolierung der Stoffe durch Extraktion	4
chem. Trennungsgang	5 - 6
fraktionierte Adsorption	7
chromatographische Trennung	7 - 9
4. Wirkung der Inhaltsstoffe	
Diffusionstest, Auflegen von Chromatogrammausschnitten, Glasplattentest	9 - 10
Mikro-Stickstoffbestimmungen	10
Suspensionsdichte-Messungen	10 - 11
Warburg-Atmungsmessungen	11 - 12
III. Versuche und ihre Ergebnisse	
A. Vorversuche	
Diffusionstest	13 - 17
Suspensionsdichte-Messungen	17 - 27
Mikro-Stickstoffbestimmungen	27 - 28
B. Isolierung der Stoffe	
phenolische Stoffe	29 - 30
flavonoide Stoffe	30 - 31
C. Einwirkung auf Azotobakter	
Auflegen von Chromatogrammausschnitten erhalten aus Gesamtauszügen	32 - 34
Auflegen von Chromatogrammausschnitten erhalten aus dem chemischen Trennungsgang	34 - 36
Warburg-Atmungsmessungen	
phenolische Stoffe in höheren Konzentrationen	36 - 51
phenolische Stoffe in niederen Konzentrationen	52 - 53
flavonoide Stoffe	53 - 55
D. Ergebnisse der chromatographischen Prüfung der Endprodukte nach Einwirkung der Stoffe	56 - 59
E. Zusammenfassung	60 - 61
F. Literaturverzeichnis	62 - 64

Die Bedeutung der aus Pflanzen isolierten Stoffe für die Medizin erfreute sich schon sehr früh einer angemessenen Beachtung. Später wurde die gegenseitige Beeinflussung von Pflanzen durch wirksame Inhaltsstoffe erkannt. Molisch (1937) untersuchte in einer Arbeit "Über den Einfluß einer Pflanze auf die andere (Allelopathie)" besonders die Wachstumshemmung höherer Pflanzen durch Äthylen. Als Äthylenspender diente ihm das Fruchtfleisch von Äpfeln. Grümmer (1955) bezog auch niedere Pflanzen in seine Untersuchungen ein und gab ein umfassendes Bild der gegenseitigen Beeinflussung von Pflanzen. Die Bedeutung von Pflanzenstoffen im Wirkstoffkreislauf der Natur wurde in den letzten Jahren erkannt. Maßgebend hierfür waren die gleichzeitigen Untersuchungen von Brian und seinen Mitarbeitern (1951), Blanchard und Diller (1951) und Winter und Willeke (1951). Sie konnten die Aufnahme organischer Moleküle durch die Pflanzenwurzeln feststellen und diese auch in den oberirdischen Organen der Versuchspflanzen nachweisen. Die Vorstellung Liebig's von der mineralischen Ernährung der Pflanze fand durch die Anschauung Thaers über die Aufnahme organischer Moleküle durch die Wurzeln höherer Pflanzen eine wertvolle Ergänzung. Winter und Schönbeck schreiben dazu in einem 1959 erschienenem Sonderdruck "Zum Wirkstoffkreislauf Pflanze-Tier-Boden": "Nicht nur der Gehalt des organischen Düngers an Kernnährstoffen und Spurenelementen und seine physikalisch-chemischen, bodenverbessernden Eigenschaften fallen ins Gewicht, sondern sein Gehalt an organischen Substanzen kann als solcher völlig neue, bisher für undiskutabel gehaltene qualitätsbestimmende Eigenschaften besitzen."

In den folgenden Jahren erschien eine große Anzahl von Arbeiten, die sich mit der Frage beschäftigten, welche Stoffe bevorzugt von der Pflanze aufgenommen werden und welche Bedeutung diese Stoffe für die Pflanze haben. Es sollen in diesem Rahmen nur einige wichtige Arbeiten wiedergegeben werden: Winter und Siewers stellten 1952 fest, daß in der Blattstreu einer Reihe von Pflanzen kaltwasserlösliche Hemmstoffe auftreten, die die Keimung vieler Pflanzen zumeist ungünstig beeinflussen. Börner gelang 1956 der Nachweis, daß zu den hemmenden Stoffen vor allem die Phenolkarbonsäuren gehören. Batesmith (1954) stellte fest, daß von 467 Dikotyledonen-Arten 66 % Kaffeesäure, 48 % p-Cumarsäure, 26 % Sinapinsäure und 33 % Ferulasäure enthielten.

Die Untersuchungen über die Aufnahme und Einwirkung phenolischer Verbindungen bei höheren Pflanzen setzen A.G. Winter und seine

Mitarbeiter zur Zeit noch fort. In einer 1959 erschienenen Abhandlung wurde die Aufnahme freien Phenols durch die Wurzeln höherer Pflanzen nachgewiesen und dessen Auftreten in oberirdischen Organen festgestellt. Als autochthone Substanz tritt freies Phenol nur in wenigen Pflanzenarten auf; es kann jedoch, da Abwässer häufig größere Mengen Phenol enthalten, als allochthone Substanz in die Pflanzen eindringen. Hier zeigt sich, wie auch in anderen Fällen, eine Abhängigkeit des Wirkstoffgehaltes vom Standort.

Interessant ist die Feststellung, daß viele von den Pflanzen aufgenommenen Wirkstoffe in der Pflanze in andere Verbindungen übergeführt werden können. Reznik und Urban zeigten in einer 1957 erschienenen Arbeit, daß die Zimtsäure - Derivate Grundstoffe in der Biogenese vieler sekundärer Pflanzenstoffe darstellen. P-Cumarsäure wird von den Verfassern als Vorstufe für die Bildung von Apigenin, Kämpferol und Pelargonidin genannt; Kaffeesäure als Grundsubstanz für die Biogenese von Luteolin, Quercetin, Cyanidin und Aureusidin. Es zeigt sich darin die nahe Verwandtschaft phenolischer und flavonoider Stoffe, deren Übergänge ineinander in vitro und in vivo zum Teil möglich sind. Die gleichen Verfasser beschrieben auch die Umformung der Ferulasäure in Chlorogensäure. Winter, Peuss und Schönbeck (1959) konnten zeigen, daß in wässrigen Lösungen mit 50 - 100 γ / ccm p-Oxybenzoesäure, p-Oxyzimtsäure, Vanillinsäure, Ferulasäure, Salicylsäure, Brenzkatechin, Resorcin, Hydrochinon, Phloroglucin von Weizenwurzeln resorbiert und zum Teil in andere Verbindungen übergeführt wurden, vor allem in Glycoside. Sie wiesen im selben Jahr nach, daß das von den Weizenwurzeln aufgenommene Cumarinderivat Aesculetin in das Aesculin umgeformt wird. Die Verfasser vertreten darüber hinaus die Ansicht, daß auch niedere Organismen in diesen Wirkstoffkreislauf eingeschaltet sind, indem sie das aus den Blättern und Früchten der Roßkastanie freiwerdende Aesculin in das Aglycon Aesculetin überführen, das dann von den Wurzeln verschiedener Gramineen resorbiert und wieder in das Aesculin übergeführt werden kann.

Die Bedeutung niederer Organismen für die Verarbeitung aus Pflanzenresten freiwerdender Stoffe interessierte uns im Rahmen dieser Arbeit am meisten. Melin (1946) untersuchte Laubstreu von Ahorn, Buche, Birke, Eiche, Espe und Kiefer auf fungistatische Substanzen. Er stellte eine Zunahme von Hemmstoffen in Herbstblättern fest. Winter und L. Willeke (1952) prüften mehrere hundert Pflanzenarten auf deren Wirkstoffe im grünen Laub und in der Blattstreu. Die Auszüge wurden gegen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* im Diffusionstest auf Hemmstoffe und fördernde Stoffe

geprüft. Sie konnten für die bei uns heimischen Laubbaumarten, wie Buche, Eiche, Birke und Ahorn auf die getesteten Bakterien keine Wirkung feststellen; während sie nach den Untersuchungen von Melin stark fungistatische Wirkungen aufwiesen. Auch Blattstreu von Trauerweide, Erle, Walnuß, Roßkastanie, Linde und Haselnuß zeigte auf die drei genannten Bakterienarten keine bactericide bzw. bacteriostatische Wirkung. Das schließt nicht aus, daß diese Blätter nicht auf andere Organismen einwirken. So konnte Ferenczy in einer Arbeit über "Occurrence of antibacterial compounds in seeds and fruits" zeigen, daß von 512 untersuchten Pflanzenarten 52 Arten auf Bodenbakterien antibiotisch wirkende Stoffe enthielten. 1956 untersuchte Knösel die Einwirkung von p-Oxybenzoesäure auf Mikroorganismen. Er konnte bei Azotobakter außer einer Herabsetzung der Keimzahl keine nennenswerten Einflüsse feststellen. Bukatsch (1956) zeigte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, daß Alkaloide an den Chondriosomenäquivalenten der Bakterienzelle gespeichert werden, wo sie enzymatische Vorgänge zu blockieren vermögen. Bukatsch machte auch die ersten Testversuche mit Kaltwasser-Blattauszügen auf Azotobakter, die Grundlage dieser Arbeit wurden. Das Bakterium wählten wir wegen seiner weiten Verbreitung und seiner großen Bedeutung als stickstoffbindender Mikroorganismus.

Als Ausgangsmaterial dienten Laubblätter einheimischer Bäume. Die Blätter wurden im Herbst trocken von den Bäumen geerntet und in Cellophanbeuteln bei gleichbleibender niedriger Temperatur aufbewahrt. Zur Feststellung einer vermutbaren chemischen Veränderung der Inhaltsstoffe bei längerer Lagerung des Materials standen geringere Blattmengen aus den Jahren 1954 bis 1958 zur Verfügung. Die Testung der Inhaltsstoffe wurde an verschiedenen Stämmen von *Azotobakter* vorgenommen. Als Teststämme verwendeten wir:

Azotobakter chroococcum;

Stamm: ATCC 4412 (Americ. Type-Culture-Collection),

Stamm: B/A II (Bot. Institut München),

Azotobakter agile (Bot. Institut München).

Größere morphologische Unterschiede zeigten sich bei den Stämmen von *Azotobakter chroococcum* im Vergleich zu *Azotobakter agile*; letzter schied ein gelbgrün fluoreszierendes Pigment aus. Die Bakterien wurden auf Schrägröhrchen gezogen und laufend mikroskopisch auf Reinheit geprüft.

Als Nährmedium diente eine Nährlösung folgender Zusammensetzung: 20 g Mannit, 1 g CaCO_3 , 0,5 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g FeSO_4 , 0,005 g Na_2MoO_4 auf 1000 ml dest. Wasser. Für festen Nährboden wurden außerdem 2 % Agar zugefügt.

Die Extraktion der Inhaltsstoffe erfolgte nach vorheriger Zerkleinerung im Mixgerät 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Es wurden Kaltwasserauszüge hergestellt. Anschließend nahmen wir eine Heißwasser- und metanolische Extraktion vor, um den Gehalt der Blätter an nicht kaltwasserlöslichen Wirkstoffen festzustellen. Das Verhältnis der Blattmenge zum Extraktionsmittel betrug stets 1 : 10, es wurden 50 g Blattmaterial mit 500 ml Extraktionsmittel versetzt. Die Färbung der Auszüge ließ vielfach schon auf den Gehalt an phenolischen und flavonoiden Stoffen schließen. Durch vorsichtige Neutralisation gelang es in einigen Fällen, flavonoide Stoffe auszufällen. Dies wirkte sich bei der sonst schwierigen Trennung der Stoffgruppen erleichternd aus.

Zur Einengung der Auszüge verwendeten wir den Heißluftverdampfer. Sie wurde auf 1/10 Volumen vorgenommen. Die Auszüge bewahrten wir bei 2 - 4 Grad Celsius im Eisschrank auf.

Zur Trennung der Stoffe bedienten wir uns verschiedener Methoden. Es sollen zunächst zwei Methoden beschrieben werden, durch die der Gesamtauszug in einzelne Stoffgruppen getrennt wurde.

1. Der chemische Trennungsgang

Vor Behandlung der Auszüge wurden diese nochmals filtriert und nach Neutralisation vom Unlöslichen dekantiert; abfiltrierte und dekantierte Bestandteile wurden später getrennt untersucht.

Trennungsgang 1 a lieferte in Äther und Wasser lösliche Stoffe: Säuren, Basen, Aldehyde, Ketone, Alkohole.

Er wurde nach der Methode von Staudinger ausgeführt. Zur genaueren Erklärung sei das Beispiel von *Acer pseudoplatanus* beschrieben.

100 ml Blattauszug (pH 5,0)
Zugabe von 75 ml n/50 HCl (pH 3,5)
davon 100 ml mit 100 ml Äther ausschütteln

Abdampfen d. restl. Äthers
= salzsaure Lösung, pH 3,5

Ätherlösung, 70 ml
neutralisiert mit
Sodalösung

BASEN

neutralisiert mit n/50
NaOH
eingeengt 15 : 1

Ätherlösung wässr. Lösung

ALKOHOLE

ALDEHYDE

KETONE

eingeengt 15 : 1

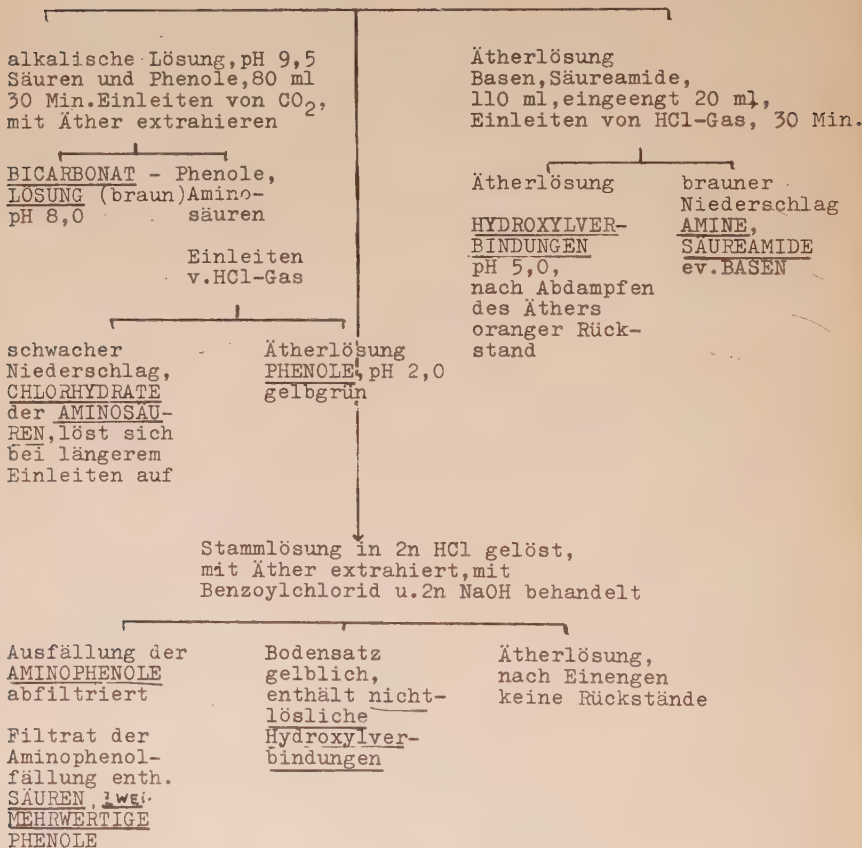
SÄUREN

eingeengt
15 : 1

Trennungsgang 1 b lieferte in Äther und Wasser lösliche Stoffe: Säuren, aromatische Aminosäuren, mehrwertige Phenole, Amine, Amino-phenole, Säureamide und Hydroxylverbindungen.

Für die Trennung der Stoffe in den Blattauszügen erwies sich dieser Trennungsgang als besonders geeignet. Er soll ebenfalls am Beispiel von *Acer pseudoplatanus* beschrieben werden.

100 ml Auszug, pH 5,0
Zugabe von 10 ml 30 % - iger NaOH,
nach 30 Minuten Ausschüttlung m. Äther,
mehrmals 100 ml, bis Ätherlösung farblos



Die Testung der Bakterien mit diesen Fraktionen erfolgte in der ursprünglichen Form und nach vorheriger Neutralisation mit verdünnter (2n) Natronlauge und Salzsäure.

2. Die fraktionierte Adsorption an Aluminiumoxyd

Während der chemische Trennungsgang nicht für alle Blattauszüge Anwendung fand, wurde die fraktionierte Adsorption an Aluminiumoxyd stets durchgeführt.

50 ml Blattauszug schüttelten wir mit steigenden Mengen Aluminiumoxyd (für Chromatographie), bis die überstehende Flüssigkeit nahezu farblos war. Das Aluminiumoxyd zeigte gelbe bis braune Färbung. Die Elution erfolgte mit 1,5n und 3n H_2SO_4 . Da Flavonole an Aluminiumoxyd stärker adsorbiert werden als Phenole, wurde damit eine grobe Trennung der beiden Stoffgruppen erreicht. Vom Grad der Trennung überzeugte eine Probe mit $FeCl_3$, die die Phenolfraktion stark grün, blau oder braun anfärbte, während die Flavonolfraktion mit $FeCl_3$ nur eine schwache Farbreaktion gab. Durch anschließende Neutralisation und Einleiten von Kohlendioxyd konnten die Phenole zum großen Teil ausgefällt werden. Dadurch war außerdem noch eine teilweise Trennung von Carbonsäuren möglich, die dabei in Lösung blieben.

Die letzte Auftrennung erfolgte mittels Papierchromatographie. Nach Prüfung mehrerer Lösungsmittel beschränkten wir uns für phenolische Stoffe und die Aglycone der Flavonolfraktion auf

1. Butanol - Eisessig - Wasser (4:1:5);

während für die Glycoside der Flavonolfraktion

2. Essigester - Ameisensäure - Wasser (10:2:3)

Verwendung fand.

Von allen geprüften Lösungsmitteln wurden für Phenole außerdem

3. Benzin - Butanol - Wasser (19:1:10)

und für Flavonole

4. m-Kresol-Eisessig - Wasser (50:2:48);

5. Chloroform - Isobutanol - Wasser (2:4:4)

als besonders günstig befunden.

Die Chromatographie erfolgte auf ca 30 x 30 cm messenden Bögen der Papiersorte Schleicher & Schüll 2043b, aufsteigend, unter Verdunklung und bei konstanter Temperatur. Es wurden stets 50 μ jeder Fraktion mit Hilfe einer Mikropipette in Form eines kurzen

Striches aufgetragen. Die Vergleichssubstanzen verwendeten wir in einer Konzentration von 0,2 % .

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte im Tageslicht, im UV - Licht und nach Besprühen mit spezifischen Entwicklerreagenzien. Um eine ungefähre Vorstellung von der Konzentration der aus den Fraktionen erhaltenen Inhaltsstoffe zu bekommen, verglichen wir die Intensität der Flecken im UV-Licht mit der Intensität der betreffenden Vergleichssubstanzen bekannter Konzentration. Letztere wurde mit 5 " + " angegeben und die Fleckenintensität der gefundenen Stoffe dagegen abgestuft.

Nach Erprobung einer größeren Anzahl von Entwicklerreagenzien verwendeten wir

1. für phenolische Stoffe:

FeCl_3 , 1% - ig, methanolisch,
braune, graue und blaue Flecken;
Paulys Reagens= diazotierte Sulfanilsäure
gelbe, braune und rote Flecken;

2. für flavonoide Stoffe:

NH_3 , Einwirkung von NH_3 - Dämpfen auf das angefeuchtete Chromatogramm:
gelbe bis gelbbraune Flecken;
 AlCl_3 , 1% - ig, methanolisch,
gelbe bis braune Flecken;
stark gelbe Fluoreszenz im UV-Licht.

Ein weiterer Versuch zur Trennung phenolischer und flavonoider Stoffe auf dem Wege der Papierchromatographie sei nur am Rande erwähnt. Es wurden dazu Papiere der Sorte S. & S. 2043b mit verschiedenen Gemischen von Zellulosepulver und Aluminiumoxyd in Methanol getränkt, anschließend bei 70 - 80 Grad Celsius getrocknet und so zur Chromatographie verwendet. Das Tränken erfolgte mittels einer Kunststoffwanne, die das Gemisch enthielt, durch welches die Bogen einmal gezogen wurden. Die Methode hatte den Vorteil, daß wegen der stärkeren Adsorption der Flavonole an Aluminiumoxyd diese Stoffe viel langsamer wanderten als die Phenole, wodurch bessere Trennungen erreicht wurden. Da aber auf der Grundlage der Adsorptions-Vorbehandlung bereits eine weitgehende Trennung der beiden Stoffgruppen gelungen war, wurde diese Methode nur gelegentlich bei eini-

gen Gesamtauszügen angewandt. Sie hatte den Nachteil, daß eine Festlegung neuer Rf-Werte für die einzelnen Substanzen notwendig war.

Wirkung der Inhaltsstoffe

1. Diffusionstest

Bei der Feststellung der Einwirkung der gefundenen Inhaltsstoffe bedienten wir uns zunächst des Diffusionstestes auf Petrischalen. Sie wurden mit je 20 ml einer mit 2 % Agar versetzten Nährlösung gefüllt. Nach Erkalten übergossen wir die Platten mit einer frisch bereiteten Bakteriensuspension. Nach 2-stündiger Anwuchszeit erfolgte die Ausstanzung eines 1 cm Durchmesser messenden Scheibchens. Jede Ausstanzung erhielt 0,4 ml eines Auszuges bzw. einer Fraktion. Die Bebrütung der Platten wurde 72 Stunden im Brutschrank bei 28 Grad Celsius vorgenommen. Die Beobachtung des Wachstums erfolgte nach je 24 Stunden.

2. Auflegen von Chromatogrammausschnitten

Neben dem Lochtestverfahren bedienten wir uns auch der Methode des Auflegens von Chromatogrammausschnitten auf Agarplatten. Da die Konzentration des in einem Ausschnitt enthaltenen Inhaltsstoffes sehr gering war, wurden mehrere Chromatogrammausschnitte gleichen Rf-Wertes übereinandergelegt. Um einen Vergleich mit der Wirkung der betreffenden Reinsubstanzen anstellen zu können, war die Anfertigung eines Testbesteckes nötig. Es wurde ein quadratisches Stück Chromatographierpapier abgemessen und mit einer festgelegten Menge gelösten Wirkstoffes bekannter Konzentration getränkt. Nach Trocknen schnitten wir das Papier in einzelne Quadrate einheitlicher Größe, deren Wirkstoffgehalt nun festlag. Diese Papierstücke dienten als Vergleichssubstanzen bei diesen Versuchen.

3. Glasplattentest

Für Blattauszüge, die reich an stark wirkenden Inhaltsstoffen waren, entwickelten wir ein besonderes Verfahren, das die Bezeichnung Glasplattentest erhielt. Die unentwickelten Chromatogramme wurden so lange getrocknet, bis das Lösungsmittel vollkommen verdunstet war. Danach legten wir sie auf Glasplatten einheitlicher Größe und

besprühten sie mit einer Bakteriensuspension in 4-fach konzentrierter Nährlösung. Die Platten wurden waagrecht - durch Gummistopfen getrennt - in eine Glaswanne gebracht, die mit Pergament abgeschlossen wurde. Die Bebrütung erfolgte 12 Stunden im Brutschrank bei 28 Grad Celsius. Danach besprühten wir die Platten mit einer 0,5 %- igen Lösung von Triphenyltetrazoliumchlorid. Es zeigte sich dabei eine unterschiedliche Rosa-bis Rotfärbung des Bakterienaufwuchses. Sie gab Aufschluß über den Lebenszustand der Bakterien und damit über den Grad besonders der toxisch wirkenden Inhaltsstoffe. Da aber die aufgesprühte Nährlösung mengenmäßig gering war, konnten auch stark fördernde Stoffe auf diese Art nachgewiesen werden.

4. Mikro-Stickstoffbestimmungen

Sie wurden mit einigen Blattarten verschiedener Jahrgänge durchgeführt. Der Ansatz dazu erfolgte nach folgendem Schema:

1. 20 ml Bakt.-Suspension + 5 ml Wasser;
2. 25 ml Blattauszug; umgerechnet auf 5 ml ;
3. 20 ml Bakt.-Suspension + 5 ml Blattauszug.

1. und 3. wurden 5 Tage bei 23 Grad Celsius auf der Schüttelmaschine in Erlenmeyer-Kolben (200 ml) belassen. Zur Feststellung der Suspensionsdichte bei Ansatz des Versuches bedienten wir uns der Lichtabsorption im Universal-Kolorimeter nach Lange. Die Menge des während dieser Zeit gebundenen Stickstoffs wurde nach der Methode der Mikro-Stickstoffbestimmung aus Beloserski^x bestimmt. Die Differenz aus 1. und 3. unter Beachtung der Werte von 2. gab Aufschluß über die Beeinflussung der Stickstoffbindung bei Einwirkung von Blattauszügen.

5. Suspensionsdichte-Messungen

Es wurde eine nephelometrische Bestimmung der Suspensionsdichten bei Einwirkung von Gesamtauszügen verschiedener Jahrgänge vorgenommen. Als Messinstrument diente das Lange-Universal-Kolorimeter (Blaufilter). Der Ansatz erfolgte nach folgendem Schema:

1. 100 ml Nährlösung + 100 ml Wasser + 25 ml Bakt.-Susp.
2. 100 ml Nährlösung + 100 ml Blattauszug + 25 ml Bakt.-Susp.
3. 100 ml Nährlösung + { 100 ml Blattauszug + 25 ml Bakt.-Susp.
 { vorher mit Hautpulver
 behandelt. }

^x Kjeldahl-Stickstoffbestimmung aus A.N. Beloserski u. N.J. Proskurjakow „Praktikum der Biochemie der Pflanzen“ S. 120-122. (1956)

Die Dichte der Bakteriensuspension entsprach einem Extinktionswert von 0,25. Bei 3. wurde der Blattauszug 2-mal mit Hautpulver behandelt, wodurch der Hauptteil phenolischer Substanzen, z.B. auch Gerbstoffe, entfernt wurde. Da die Werte bei den mit Blattauszügen versetzten Bakteriensuspensionen wegen der Eigenfärbung der Auszüge von Anfang an bedeutend höher lagen, wurde der erste Wert jeder Ablesung auf einen gemeinsamen Ausgangswert bezogen. Die Ablesung erfolgte in Zeitabständen von 12 Stunden.

6. Warburg-Atmungsmessungen

Wichtige Einblicke in die Intensität des Stoffwechsels bei Einwirkung von Inhaltsstoffen gestattete die Ermittlung der Atmungsgrößen. Sie wurde im Warburg-Apparat ausgeführt. Die Werte geben die verbrauchte Menge Sauerstoff an.

Für die Berechnung der Atmungsintensität dienten die Gefäßkonstanten, die nach der Formel

$$K = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha}{p_0}$$

ermittelt wurde.

Das Volumen V des gesuchten Gases wird aus dem Produkt $V = h \cdot K$ bestimmt, wobei h den Manometerausschlag in mm Brodierlösung angibt.

Die Bakterien wurden 12 Stunden vor dem Versuch in Nährlösung bei 28 Grad Celsius vorgebrütet und zu Beginn der Versuche mit 1-% iger gepufferter Glucose versetzt. Nach bestimmter Zeit gaben wir je 0,5 ml gelösten Inhaltsstoffes* bekannter Konzentration durch Kippung zur Suspension. Die Wirkung auf die Atmung der Bakterien wurde mit derjenigen verglichen, die nach Zugabe der aus den Chromatogrammausschnitten eluierten Inhaltsstoffe auftrat. Die Extraktion der Zonen nahmen wir mit verdünntem Äthanol vor, und die Eluate wurden nach Einengung bis zur Trockene mit wenig Wasser aufgenommen. Die Chromatogrammausschnitte prüften wir nach der Elution mit Hilfe der oben angegebenen spezifischen Entwicklerreagenzien auf etwa zurückgehaltene Inhaltsstoffe. Die Herauslösung war in den meisten Fällen vollständig.

Mit der Verwendung gepufferter und ungepufferter Substanzen bezweckten wir eine Unterscheidung der Wirkung der Stoffe in mole-

*(Reinsubstanz)

kularer Form und als Ionen. Zur Pufferung fand ein Phosphatpuffer nachstehender Zusammensetzung Verwendung: 4 Teile 15 mol KH_2PO_4 + 6 Teile 15 mol Na_2HPO_4 .

Die Ergebnisse der Atmungsversuche stellen stets Mittelwerte aus 3 Parallelversuchsreihen dar.

Versuche und ihre Ergebnisse

Unser Interesse galt zunächst der Frage, welche Blattarten überhaupt einen nennenswerten Einfluß auf Azotobakter ausüben. Es wurden deshalb trockene Herbstblätter von 17 Familien einheimischer Laubbäume mit insgesamt 56 Arten im Plattentest auf ihren Einfluß auf Azotobacter chroococcum geprüft. Diese Versuche ermöglichten uns eine Auswahl der wirksamsten Pflanzen für weitere Untersuchungen.

Da von einigen Blattarten geringe Mengen von vergangenen Jahren zur Verfügung standen, interessierte es uns zu erfahren, inwieweit sich diese Blätter von denen der neuen Ernte in ihrer Einwirkung auf Azotobakter unterscheiden. Es handelte sich dabei um Blattproben folgender Arten: *Fagus silvatica*, *Carpinus betulus*, *Acer pseudoplatanus*, *Juglans regia* und *Sorbus aucuparia*.

Für einen Vergleich ihrer Wirkung wurden zunächst sämtliche Blattarten der Jahrgänge 1954 und 1958 im Plattentest auf Azotobacter chroococcum beider Stämme und Azotobacter agile geprüft.

Messungen der Suspensionsdichten bei Einwirkung von Gesamtauszügen dieser Blätter vermittelten ein Bild der unterschiedlichen Einwirkung von Blattauszügen verschiedener Jahrgänge.

Schließlich konnten durch Mikro-Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl aus Beloserski obige Feststellungen bestätigt werden.

Es sollen zunächst die Ergebnisse der Einwirkung von Gesamtauszügen des Jahrganges 1959 auf Azotobacter chroococcum besprochen werden. Eine Gesamtübersicht ihrer Wirkung im Diffusionstest gibt die Tabelle I wieder.

Zeichenerklärung zu Tabelle I :

O	= ohne Befund;		
+	= größer als 0,1 cm Förderung;	-	= größ. als 0,1 cm Hemmung;
++	= größer als 0,5 cm Förderung;	--	= größ. als 0,5 cm Hemmung;
+++	= größer als 0,9 cm Förderung;	---	= größ. als 0,9 cm Hemmung;

Wenn nach „-“ noch „+“ angegeben ist, dann schließt sich an die Hemmzone eine schmale Förderzone an.

24 48 72 96 24 48 72 96

FRAXINUS

EXCELSIOR L.

1. aurea Pers.	+	++	++	++	++	++	++	++
2. erosa Willd.	+	+	++	++	+	+	++	++
3. pendula Ait.	++	++	++	+++	++	++	++	+++
4. nana Lond.	+	++	++	+++	+	++	++	+++
5. diversifolia Ait.	+	++	++	++	++	++	++	++

JUGLANS

1. nigra L.	-	+	+	+	+	+	++	++
2. regia L.	0	-	-	-	-	-	-	-
3.								

AESCULUS

HIPPOCAST. L.

1. (bot. G.)	+	+	+	+	+	+	+	+
2. (M.)	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

TILIA

1. cordata Mill.	+	+	+++	+++	+	++	+++	+++
2. platyphyllus Scop.	+	++	+++	+++	+	+++	+++	+++
3. euchlora Koch	0	+	+	+	+	+	+	+

PRUNUS

1. padus L.	0	+	++	++	0	+	++	++
2. fruticosa Pall.	+	++	++	++	0	++	++	++
3. avium L.	+	++	++	++	0	0	0	+
4. domestica L.	+	+	+	+	+	++	++	++

BETULA

1. humilis Schrk.	-	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++
2. alba Roth.	0	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++
3. pendula Roth.	0	+	+	+	0	+	++	++

SALIX

1. caprea L.	+	+	+	+	+	+	+	+
2. alba L.	0	0	+	+	+	+	+	+
3. purpurea L.	0	+	+	+	+	++	++	++
4. fragilis L.	+	+	+	+	+	++	++	++

Anmerkung: Bei den in „()“ gesetzten Bezeichnungen handelt es sich um verschiedene Standorte einer Baumart.

(S.) Salzburger Straße,
 (R.) Romanstraße,
 (M.) G.-Meyrink-Straße. } München

Aus Tabelle I sind folgende allgemeine Erscheinungen zu ersehen:

1. stark hemmende Blattauszüge bei den Gattungen:
Fagus, Carpinus, Acer, Quercus;
2. fördernde Blattauszüge bei den Gattungen:
Sorbus, Ulmus, Fraxinus, Aesculus, Tilia, Prunus;
3. hemmende Blattauszüge mit anschließender Förderung bei den Gattungen:
Sorbus, Acer, Betula.

Die Arten einer Gattung zeigten im allgemeinen eine gleiche Tendenz in ihrer Wirkung, jedoch war der Einfluß bei den einzelnen Arten oft modifiziert. So verhielt sich Ulmus scabra beinahe neutral, ebenso Ulmus laevis, während Ulmus horizontalis stärkere Förderungen hervorrief. Diese Erscheinung läßt auf einen unterschiedlichen Gehalt an Wirkstoffen schließen. Andererseits konnten wir bei einigen Gattungen fast völlige Übereinstimmung in der Einwirkung der einzelnen Arten auf Azotobakter vermerken; so bei den bei uns heimischen Tiliaarten und bei verschiedenen Arten von Fraxinus. Bei Acer, Sorbus und Betula war das Auftreten Konzentrationsbedingter Hemmungen bei gleichzeitiger Förderung besonders deutlich. Um den Ausstich zeigte sich zunächst ein Hemmhof, auf den eine minder starke, mitunter auch größere Förderzone folgte. Die einfachste Erklärung dafür wäre eine mit zunehmender Entfernung vom Ausstich durch Diffusionsgefälle eintretende Herabsetzung der Konzentration hemmender Inhaltsstoffe, deren toxische Wirkung schließlich bei Erreichen einer bestimmten Konzentration in eine fördernde Wirkung umschlägt.

Es konnte auch eine Abhängigkeit des Gehaltes an Inhaltsstoffen vom Standort der Laubbäume festgestellt werden. Dies gilt sowohl für anorganische wie auch für organische Stoffe. Der wachstumsfördernde Einfluß von Vanadium - und Molybdänverbindungen geringer Konzentration auf Azotobakter ist schon länger bekannt. Winter und Willeke stellten die Abhängigkeit des Gehaltes der Pflanzen an organischen Inhaltsstoffen vom Standort fest.

Bei unseren Versuchen konnte besonders deutlich bei Sorbus aucuparia dreier verschiedener Standorte eine deutlich unterschiedliche Einwirkung auf Azotobakter festgestellt werden.

Im folgenden sollen die Ergebnisse der Einwirkung von Blattauszügen

verschiedener Jahrgänge auf Azotobakter dargelegt und besprochen werden. Zum Vergleich war Blattmaterial von 1954 und 1958 vorhanden.

1. Diffusionstest

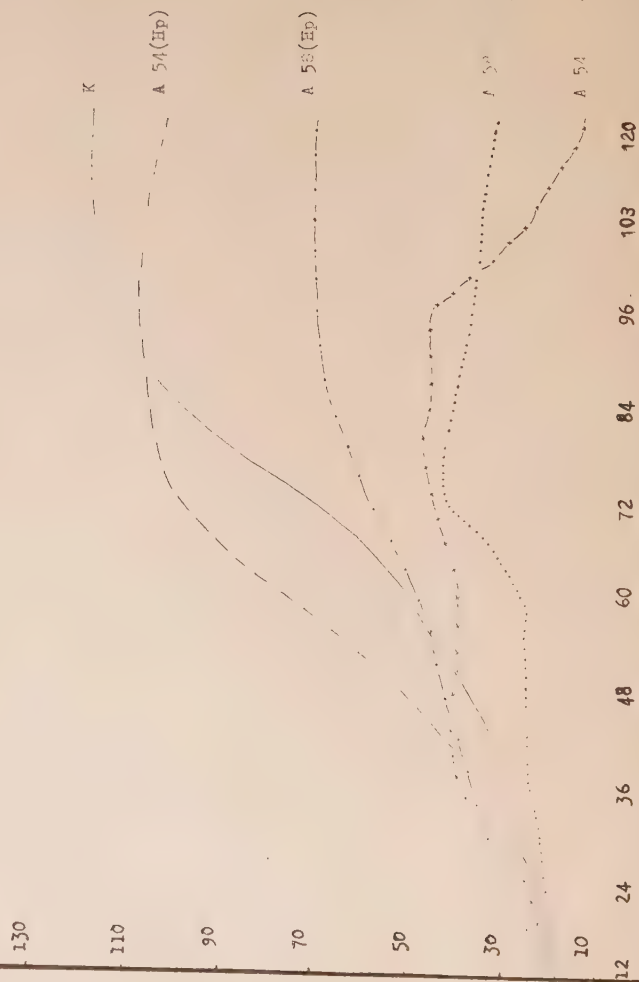
Tab. II Einwirkung von Blattauszügen der Jahrgänge 1954 und 1958 auf Azotobakter im Diffusionstest nach Stunden

Blattart	Jhg.	Azotobacter chroococcum						Azotobact.agile			
		St.ATCC 4412						St. BA II			
		nach	24	48	72	24	48	72	24	48	72 Std.
FAGUS											
silvatica	1954	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1958	--	--	--	-	-	-	-	--	--	--
CARPINUS	1954	-	--	--	-	--	--	-	--	--	--
betulus	1958	-	--	---	-	--	---	0	-	---	---
ACER	1954	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
pseudo-platanus(bot.G.)	1958	--	---	+++	--	--	--	--	--	--	--
JUGLANS	1954	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
regia	1958	-	-	+++	-	-	--	-	--	--	--

2. Suspensionsdichte-Messungen

Die unterschiedliche Wirkung der Blattauszüge beider Jahrgänge wurde auch durch Messung der Suspensionsdichte mit dem Universal-Kolorimeter nach Lange festgestellt. Der Ansatz zu diesen Versuchen ist auf Seite 10 angegeben. Die Eigenfärbung der Blattauszüge fand durch Subtraktion der dadurch bedingten Werte vom Gesamtwert Berücksichtigung.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind aus den Darstellungen 1 bis 6 zu ersehen,



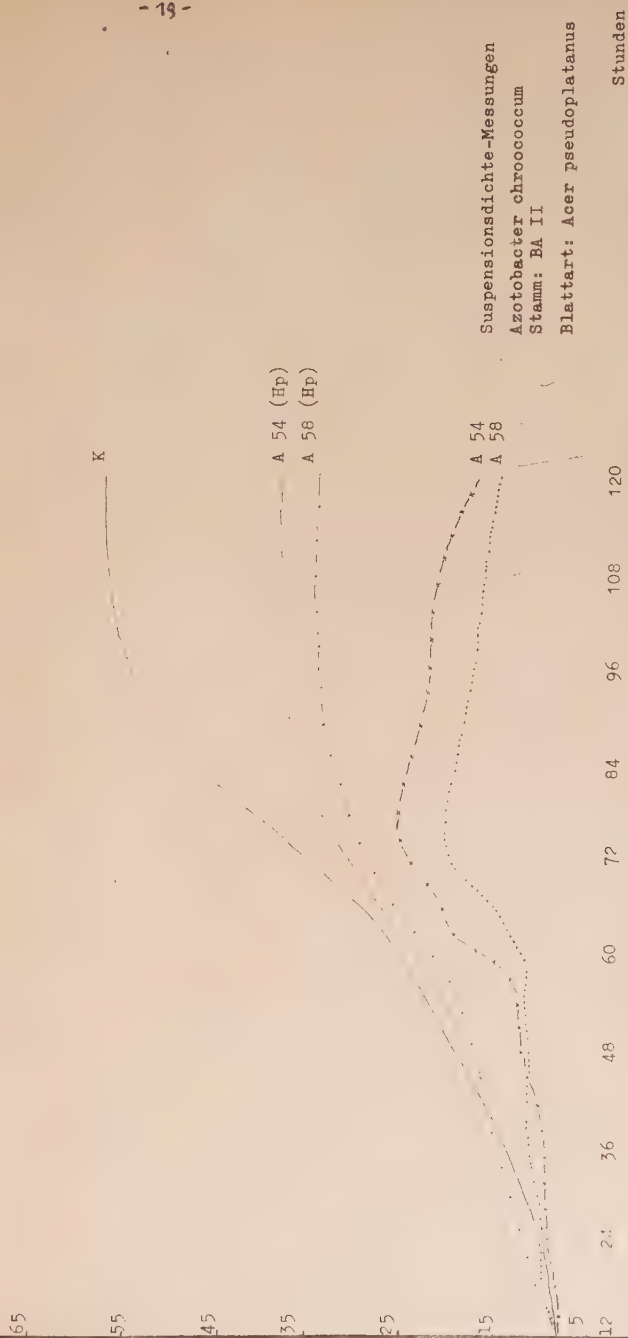
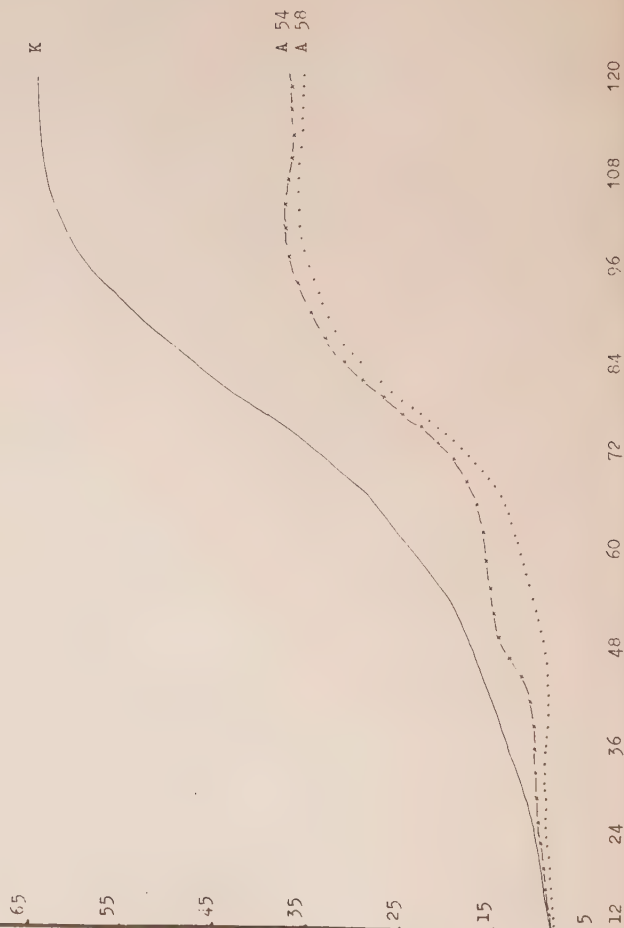
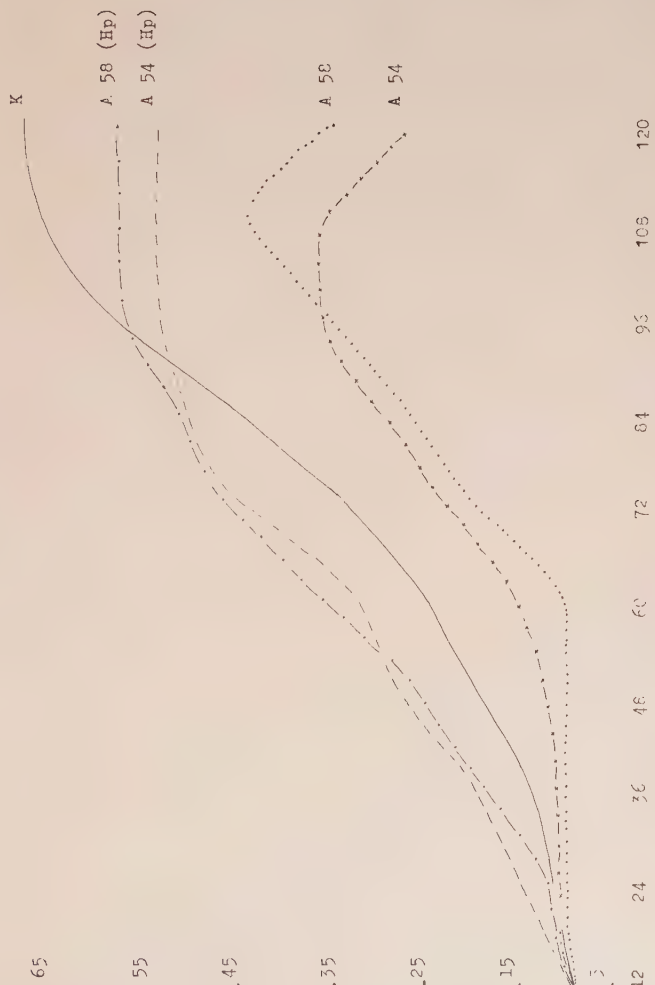


Abb. 3

Extinktion



Suspensionsdichte-Messungen
Azotobacter chroococcum
 Stamm: EA II
 Elattart: *Juglans regia*

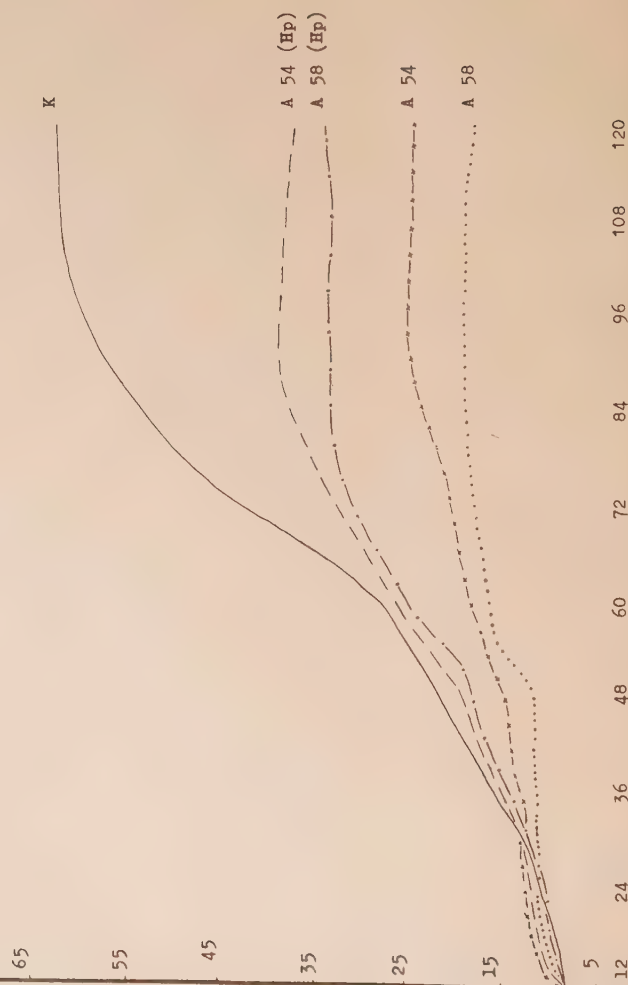


Suspensionsdichte-Messungen
 Azotobacter chroococcum
 Stamm: ATCC 4412
 Plattvari: Fagus silvatica

Stunden

Extinktion

Abb. 5

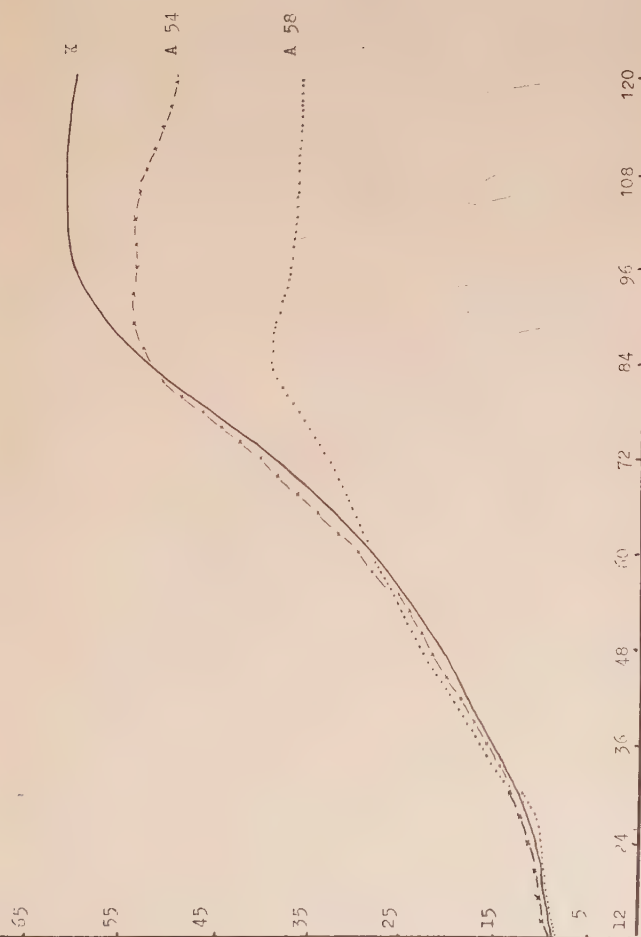


Suspensionsdichte-Messungen
Azotobacter chroococcum
Stamm: ATCC 4412
Blattart: Acer pseudoplatanus

Stunden

Extinktion

Abb. 6



Suspensionsdichte-Messungen
Azotobacter chroococcum
Stamm: ATCC 4412
Blattart: Juglans regia

Stunden

Nachstehende Übersichten geben die allgemeine Tendenz der Ergebnisse dieser Versuche wieder.

Tab. III Beeinflussung des Wachstums von *Azotobacter chroococcum*, ATCC 4412, durch Blattauszüge verschiedener Jahrgänge

Blattart	Bez. des Ansatzes	Grad der relativen hemmenden bzw. fördernden Wirkung gegenüber der Kontrolle in Stunden									
		12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
<i>Fagus-silvatica</i>	A 54	mittl. Hemmung wie Kontr. Absterben									
	A 54 (Hp.)	schw. Förderung wie Kontr. stat. Zustand									
	A 58	starke Hemmung wie Kontr. Absterben									
	A 58 (Hp.)	schw. Förderung wie Kontr. stat. Zustand									
<i>Acer pseudo-platanus</i>	A 54	stärkere Hemmung stat. Zustand									
	A 54 (Hp.)	schwache Hemmung stat. Zustand									
	A 58	starke Hemmung stat. Zustand									
	A 58 (Hp.)	schwache Hemmung stat. Zustand									
<i>Juglans regia</i>	A 54	wie Kontrolle langs. Absterben									
	A 58	wie Kontrolle mittl. Hemmung langs. Absterben									

Erklärung der Bezeichnungen:

A 54, bzw. A 58 = Auszug Jhg. 1954 bzw. 1958, s. S. 10 unten, Bez. 2

A 54 (Hp.) bzw. A 58 (Hp.) = Auszug Jhg. 1954 bzw. 1958, s. S. 10 unten, Bez. 3

Tab. IV Beeinflussung des Wachstums von *Azotobacter chroococcum*, BA II, durch Blattauszüge verschiedener Jahrgänge

Blattart	Bez.des Ansatzes	Grad der relativen hemmenden-fördernden Wirkung gegenüber der Kontrolle in Stunden									
		12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
<i>Fagus silvatica</i>	A 54	Förderung Hemmung stat.Zustand Absterben ← x x x x x x x x x x →									
	A 54 (Hp.)	Förderung stat.Zustand ← x x x x x x x x x x →									
	A 58	wie starke Hemmung Kontr.langs.Absterben ← x x x x x x x x x x →									
	A 58 (Hp.)	schwache Förderung stat.Zustand ← x x x x x x x x x x →									
<i>Acer pseudo-platanus</i>	A 54	wie stärkere Hemmung Kontr.langs.Absterben ← x x x x x x x x x x →									
	A 54 (Hp.)	fast wie Kontrolle stat.Zustand ← x x x x x x x x x x →									
	A 58	wie starke Hemmung Kontr.langs.Absterben ← x x x x x x x x x x →									
	A 58 (Hp.)	fast wie Kontrolle stat.Zustand ← x x x x x x x x x x →									
<i>Juglans regia</i>	A 54	wie mittl.Hemmung Kontr. stat.Zustand ← x x x x x x x x x x →									
	A 58	wie stärkere Hemmung Kontr. stat.Zustand ← x x x x x x x x x x →									

Acer pseudo-platanus und *Fagus silvatica* zeigen folgende Erscheinungen:

1. bei Einwirkung auf *Azotobacter chroococcum*, Stamm ATCC 4412,
 - a) während der ersten Hälfte der Versuchsdauer starke Verzögerung des Bakterienwachstums bei Zugabe von Blattauszügen des Jahrganges 1958; mittlere Verzögerung bei Auszügen des Jahrganges 1954.

- b) Bei *Fagus silvatica* folgt auf die Verzögerungsphase eine Angleichung an das normale Wachstum der Kontrolle, danach ein rasches Absterben. Bei *Acer pseudoplatanus* wird nach der Verzögerungsphase ein stationärer Zustand erreicht.
- c) Bei Behandlung der Auszüge mit Hautpulver zur Bindung eines großen Teiles der Gerbstoffe, war nach Einwirkung dieser gerbstoffarmen Auszüge bei *Fagus silvatica* 1954 mit ersten Drittel der Versuchsdauer eine schwache Förderung des Bakterienwachstums festzustellen. Darauf folgte eine schwache Verzögerung des Wachstums, die schließlich in einen stationären Zustand überging. Diese Erscheinung stimmt damit überein, daß hemmende Wirkstoffe in geringer Konzentration fördernde Wirkungen entfalten können. Entsprechend trat bei den stärker wirkenden Auszügen von *Fagus silvatica* 1958 und *Acer pseudoplatanus* 1954 und 1958 eine Abschwächung der hemmenden Wirkung nach Hautpulverbehandlung der Auszüge auf. Daraus geht die Bedeutung von Gerbstoffen als bakteriostatische Komponente der Extrakte hervor.

2. Einwirkung auf *Azotobacter chroococcum*, Stamm BA II;

- a) Bei *Fagus silvatica* 1954 war im ersten Drittel der Versuchsdauer eine schwache Förderung festzustellen. Darauf folgte eine Hemmung des Bakterienwachstums. Sie trat stets nach förderndem Einfluß eines Auszuges auf und ist wahrscheinlich auf die Anhäufung schädlicher Stoffwechselprodukte der Bakterien zurückzuführen.

Bei *Fagus silvatica* 1958 war in der ersten Hälfte eine starke Hemmung des Bakterienwachstums festzustellen, der mit der Zeit eine Angleichung an das Wachstum der Kontrolle folgte. Diese Erscheinung war bei stärker wirkenden Blattauszügen allgemein feststellbar.

- b) Bei den mit Hautpulver behandelten Auszügen war bei *Fagus silvatica* die Förderung stärker und anhaltender. Bei derselben Art des Jahrganges 1958 schlug die hemmende Wirkung des unbehandelten Auszuges in eine schwach fördernde des Hautpulverbehandelten um. Diese Erscheinung läßt sich ebenfalls durch die Konzentrationsabnahme phenolischer Stoffe bei Hautpulverbehandlung erklären. Auch hier folgte auf den för-

dernden Einfluß eine Hemmung des Bakterienwachstums. Da die Auszüge von *Acer pseudoplatanus* beider Jahrgänge reicher an phenolischen Inhaltsstoffen waren, war auch bei Einwirkung hautpulverbehandelter Auszüge dieser Art noch eine schwach hemmende Wirkung festzustellen. Die Folge davon war ein stationärer Zustand.

3. Mikrostickstoffbestimmungen

Über die an denselben Blattauszügen - unter Einbeziehung von *Carpinus betulus* und *Sorbus aucuparia* - durchgeführten Stickstoffbestimmungen und ihre Ergebnisse gibt nachstehende Tabelle Aufschluß. Die Angaben verstehen sich unter Berücksichtigung einer Fehlergrenze von 0,002 mg Stickstoff.

Tab. V Mikrostickstoffbestimmungen nach Kjeldahl in mg

Blattauszug	Jhg.	I	II	IIIa	IIIb	IV
1. <i>Fagus silvatica</i>	1954	0,244	0,036	0,280	0,265	-0,015
" "	1958	0,244	0,037	0,281	0,260	-0,021
2. <i>Acer pseudo-</i>	1954	0,244	0,038	0,282	0,251	-0,031
<i>platanus</i>	1958	0,244	0,039	0,283	0,242	-0,041
3. <i>Juglans regia</i>	1954	0,244	0,027	0,271	0,246	-0,025
" "	1958	0,244	0,031	0,275	0,246	-0,029
4. <i>Carpinus betulus</i>	1954	0,244	0,046	0,290	0,260	-0,030
" "	1958	0,244	0,050	0,294	0,259	-0,035
5. <i>Sorbus aucuparia</i>	1954	0,244	0,056	0,300	0,308	+0,008
" "	1958	0,244	0,059	0,303	0,313	+0,010

Bezeichnung: (vergl. auch S.10) Mitte

I = Kontrolle;

II = Blattauszug

III = zu erwartende N-Menge in mg,
falls Blattauszug nicht wirkt;

IIIb = tatsächlich ermittelte N-Menge in mg,

IV = Differenz IIIa - IIIb in mg,

S.10 Bez.1.

S.10 " 2.

S.10 " 3.

Die Ergebnisse zeigen eine Hemmung der N-Bindung bei Einwirkung der Blattauszüge 1 bis 4; bei Blattauszug 5 wurde eine schwach fördernde Wirkung auf die Stickstoffbindung festgestellt. Ein Vergleich der Wirkung von Blattauszügen der Jahrgänge 1954 und 1958 läßt den stärker hemmenden (1 bis 4), beziehungsweise stärker fördernden (5) Einfluß von Auszügen aus frischeren Blättern auf die Stickstoffbindung deutlich werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden,

1. daß die Blattauszüge recht unterschiedlich auf *Azotobacter chroococcum* wirken;
2. daß auch Blattauszüge einer Art, deren Ausgangsmaterial von verschiedenen Bäumen stammte, unterschiedliche Wirkungen zeigten;
3. daß Laubblätter älterer Jahrgänge eine schwächere Wirkung auf *Azotobakter* ausüben als die späterer Ernte.

Letzte Feststellung läßt vermuten, daß durch längere Lagerung ein Abbau wirksamer Stoffe stattfindet. Das Material für die folgenden Untersuchungen wurde deshalb in luftdicht verschlossenen Beuteln und bei niedriger Temperatur gelagert, um einen Abbau der Stoffe weitgehend zu verhindern.

Die Isolierung phenolischer und flavonoider Stoffe aus trockenem Herbstlaub

Die Ergebnisse der Trennungen sind aus den zusammenfassenden Darstellungen in den Tabellen VI und VII ersichtlich.

Tabelle VI Isolierung phenolischer Stoffe; geordnet n. Blattarten; zusammenfassende Darstellung

Vorbehandlung: fraktionierte Adsorption;
Chromatogramm: auf S. & S. 2043 b; Lösungsmittel: Butanol-Eisessig-Wasser
aufgetr. Menge: 50 γ
Extrakt.-Meth: Kaltwasser;
Blatternte : 1959

Art d. Extraktes	Rf-W.	Taglicht	UV-Licht	FeCl ₃	Pauly-Reag.
------------------	-------	----------	----------	-------------------	-------------

1. AESCULUS HIPPOCASTANUM

Gesamtauszug	0,75	-	hellblau	grünlich	rotbraun
Phenolfällung	0,76		hellblau	grünlich	rotbraun
+ Filtrat	0,79	-	blau	grün	gelb

2. QUERCUS SESSILIFLORA

Gesamtauszug	0,16	grau	violett	schwärzl.	-
Phenolfällung	0,88	-	hellblau	grünlich	rotbraun
+ Filtrat	0,16	grau	violett	schwärzl.	-
Gesamtauszug	0,86	-	hellblau	grünlich	rotbraun

3. SORBUS ARIA

Gesamtauszug	0,15	grau	violett	schwärzl.	-
Phenolfällung					
+ Filtrat	0,16	grau	violett	schwärzl.	-
Gesamtauszug	0,57	-	grau	grau	gelb
Phenolfällung	0,58	-	grau	grau	gelb
+ Filtrat					
Gesamtauszug	0,71	-	-	grau	orange-rot
Phenolfällung	0,72	-	-	grau	orange-rot
+ Filtrat					

4. TILIA CORDATA

Gesamtauszug	0,70	-	-	gräulich	orange-rot
Phenolfällung	0,72	-	-	gräulich	orange-rot
+ Filtrat					
Gesamtauszug	0,85	-	hellblau	grünlich	rotbraun
Phenolfällung	0,87	-	hellblau	grünlich	rotbraun
+ Filtrat					

conc.	Vergl.Substanz	Rf-Wert	conc.	Inhaltsstoff	Bemerkung
0,05 %	Protocatechu-S.	0,86	0,2 %	Protocatechu-S.	Ausz.st.viscos
0,12 %	Protocatechu-S.	0,86	0,2 %	Protocatechu-S.	viscos
0,03 %	Kaffeessäure	0,82	-		vermutl.Kaffe-S.
0,01 %	Ellagsäure	0,16	0,2 %	Ellagsäure	Schwanzbild.
0,18 %	Protocatechu-S.	0,89	0,2 %	Protocatechu-S.	rot verblaßt
0,10 %	Ellagsäure	0,16	0,2 %	Ellagsäure	Schwanzbild.
0,08 %	Protocatechu-S.	0,89	0,2 %	Protocatechu-S.	rot verblaßt
0,02 %	Ellagsäure	0,17	0,2 %	Ellagsäure	Schwanzbild.
0,10 %	Ellagsäure	0,16	0,2 %	Ellagsäure	Schwanzbild.
0,08 %	Gallussäure	0,58	0,2 %	Gallussäure	
0,10 %	Gallussäure	0,58	0,2 %	Gallussäure	
0,15 %	Phloroglucin	0,72	0,2 %	Phloroglucin	
0,20 %	Phloroglucin	0,72	0,2 %	Phloroglucin	
0,10 %	Phloroglucin	0,72	0,2 %	Phloroglucin	
0,12 %	Phloroglucin	0,72	0,2 %	Phloroglucin	
0,01 %	Protocatechu-S.	0,87	0,2 %	Protocatechu-S.	rot verblaßt
0,05 %	Protocatechu-S.	0,87	0,2 %	Protocatechu-S.	rot verblaßt

Art d.Extraktes	Rf-W.	Taglicht	UV-Licht	FeCl ₃	Pauly-Reag.
-----------------	-------	----------	----------	-------------------	-------------

5.a ACER PSEUDOPLATANUS (Meyr.)

5.b ACER PSEUDOPLATANUS (bot.G.)

a Gesamtauszug	0,80	-	hellblau	grünlich	rotbraun
b Gesamtauszug	0,56	-	graublau	graublau	gelb
a Gesamtauszug	0,73	-	grünlich	grünlich	gelb
a Phenolfällung + Filtrat	0,73	-	hellblau	grünlich	rotbraun
a Phenolfällung + Filtrat	0,57	-	graublau	graublau	gelb
a Phenolfällung + Filtrat	0,69	-	grau	grau	orange-rot
a Phenolfällung + Filtrat	0,17	grau	violett	schwärzl.	-
b Phenolfällung + Filtrat	0,57	-	graublau	grau	gelb
b Phenolfällung + Filtrat	0,75	-	hellblau	grünlich	rotbraun
b Phenolfällung + Filtrat	0,69	-	-	grau	orange-rot
b Phenolfällung + Filtrat	0,15	grau	violett	schwärzl.	-

Tab. VII Isolierung flavonoider Stoffe; geordnet nach Blattarten;
zusammenfassende Darstellung

Art d.Extraktes	Rf-W.	Taglicht	UV-Licht	NH ₃	AlCl ₃
-----------------	-------	----------	----------	-----------------	-------------------

1. AESCULUS HIPPOCASTANUM

Gesamtauszug	0,49	-	hellblau	-	-
1,5 n H ₂ SO ₄	0,50	-	blau	-	-
Gesamtauszug	0,69	gelb	gelb	gelb	gelb
1,5 n H ₂ SO ₄	0,70	gelb	gelb	gelb	gelb
3,0 n H ₂ SO ₄	0,70	gelb	gelb	gelb	gelb
Gesamtauszug	0,74	gelb	gelbbraun	gelb	gelb
1,5 n H ₂ SO ₄	0,74	gelb	gelbbraun	gelb	gelb
3,0 n H ₂ SO ₄	0,74	gelb	gelbbraun	gelb	gelb
1,5 n H ₂ SO ₄					

2. SORBUS ARIA

Gesamtauszug	0,44	hellbraun	braun	braun	braun
zu 1.					
1,5 n H ₂ SO ₄	0,80	gelb	gelb	gelb	gelbgrün
1,5 n H ₂ SO ₄	0,28	gelb	gelb	gelb	gelb

conc.	Vergl.Substanz	Rf-Wert	conc.	Inhaltsstoff	Bemerkung
0,05 %	Protocatechu-S.	0,84	0,2 %	Protocatechu-S. rot verblaßt	
0,05 %	Gallussäure	0,62	0,2 %	Gallussäure	
-	-	-		vermutl.Chlorogen-S.	
0,12 %	Protocatechu-S.	0,74	0,2 %	Protocatechu-S. rot verblaßt	
0,20 %	Gallussäure	0,62	0,2 %	Gallussäure	
0,03 %	Phloroglucin	0,69	0,2 %	Phloroglucin	Tgl.nicht Phl.
0,10 %	Ellagsäure	0,17	0,2 %	Ellagsäure	Schwanzbild.
0,20 %	Gallussäure	0,62	0,2 %	Gallussäure	
0,12 %	Protocatechu-S.	0,76	0,2 %	Protocatechu-S. rot verblaßt	
0,03 %	Phloroglucin	0,69	0,2 %	Phloroglucin	
0,05 %	Ellagsäure	0,17	0,2 %	Ellagsäure	Schwanzbild.

conc.	Vergl.Substanz	Rf-Wert	conc.	Inhaltsstoff	Bemerkung
0,18 %	Aesculin	0,51	0,2 %	Aesculin	
0,18 %	Aesculin	0,51	0,2 %	Aesculin	
0,18 %	Quercetin	0,70	0,2 %	Quercetin	
0,19 %	Quercetin	0,70	0,2 %	Quercetin	
0,20 %	Quercetin	0,70	0,2 %	Quercetin	
0,18 %	Quercitrin	0,79	0,2 %	Quercitrin	
0,20 %	Quercitrin	0,79	0,2 %	Quercitrin	
0,001 %	Quercitrin	0,79	0,2 %	Quercitrin	
-	-	-	-	vermutl.Hyperosid	
0,18 %	Rutin	0,45	0,2 %	Rutin	ausgefällt
0,1 %	Kämpferol	0,85	0,2 %	Kämpferol	
0,1 %	Robinin	0,30	0,2 %	Robinin	

Art d.Extraktes	Rf-W.	Taglicht	UV-Licht	NH ₃	AlCl ₃
-----------------	-------	----------	----------	-----------------	-------------------

3. QUERCUS SESSILIFLORA

Gesamtauszug	0,21	gelb	orange-br.	gelb	gelb
1,5 n H ₂ SO ₄	0,22	gelb	orange-br.	gelb	gelb
Gesamtauszug	0,69	gelb	gelb	gelb	gelb
1,5 n H ₂ SO ₄	0,70	gelb	gelb	gelb	gelb
Gesamtauszug	0,74	gelb	gelbbraun	gelb	gelb
1,5 n H ₂ SO ₄	0,74	gelb	gelbbraun	gelb	gelb

4. TILIA CORDATA

Gesamtauszug	0,54	hellblau	blau	-	-
Gesamtauszug	0,42	hellbraun	braun	braun	braun
1,5 n H ₂ SO ₄	0,44	hellbraun	braun	braun	braun

5.a ACER PSEUDOPLATANUS (Meyr.)

5.b ACER PSEUDOPLATANUS (bot.G.)

a Gesamtauszug	0,46	hellbraun	braun	braun	braun
b Gesamtauszug	0,46	hellbraun	braun	braun	braun
a Gesamtauszug	0,71	gelb	gelb	br.-grün	-
b Gesamtauszug	0,51	-	blau	-	-
b 1,5 n H ₂ SO ₄	0,50	-	blau	-	-

Anm.: In Liste VII wurde neben Flavonolen ein Pyronglukosid (Aesculin) mit angeführt.

conc.	Vergl.Substanz	Rf-Wert	conc.	Inhaltsstoff	Bemerkung
-	-	-	-	vermutl.Quercetagenin	
-	-	-	-	vermutl.Quercetagenin	
0,05 %	Quercetin	0,72	0,2 %	Quercetin	
0,10 %	Quercetin	0,72	0,2 %	Quercetin	
0,10 %	Quercitrin	0,76	0,2 %	Quercitrin	
0,12 %	Quercitrin	0,76	0,2 %	Quercitrin	
0,10 %	Aesculin	0,55	0,2 %	Aesculin	
0,01 %	Rutin	0,45	0,2 %	Rutin	ausgefällt
0,01 %	Rutin	0,45	0,2 %	Rutin	ausgefällt
0,30 %	Rutin	0,45	0,2 %	Rutin	ausgefällt
0,20 %	Rutin	0,45	0,2 %	Rutin	ausgefällt
0,20 %	-	-	-	vermutl.D-Catechin	
0,05 %	Aesculin	0,51	0,2 %	Aesculin	
0,05 %	Aesculin	0,51	0,2 %	Aesculin	

Einwirkung der aus dem Laub isolierten Stoffe auf Azotobakter

1. Auflegen von Chromatogrammausschnitten

Es lag zunächst nahe, die auf den Chromatogrammen identifizierten Stoffe direkt auf die Bakterien im Plattenverfahren einwirken zu lassen. Die Flecken wurden aus den Chromatogrammen ausgeschnitten und auf die beimpften Platten gelegt. Da sich herausstellte, daß die Mengen der Inhaltsstoffe zu gering waren, um eindeutige Wirkungen festzustellen, wurden nach der im ersten Teil der Arbeit angewandten Methode der Konzentrationsschätzung stets so viele Chromatogrammausschnitte übereinandergelegt, daß die Konzentration sämtlicher Ausschnitte eines Stoffes ca 0,1 % betrug. Wurde also ein Stoff auf dem Chromatogramm in einer Konzentration von 0,05 % festgestellt, so legten wir zwei gleichgroße Ausschnitte mit demselben Rf-Wert auf der beimpften Agar-Platte übereinander, um eine Gesamtkonzentration von 0,1 % zu erreichen. Auf diese Weise erhielten wir einen ersten Überblick über hemmende bzw. fördernde Inhaltsstoffe.

Tab.VIII Einwirkung von Inhaltsstoffen aus Chromatogrammausschnitten auf *Azotobacter chroococcum*, Stamm ATCC 4412

Blattart	Extr.-Meth.	Einwirkung n.Std.			Rf-W.	Inhaltsstoff
		24	48	72		
<i>Quercus sessiliflora</i>	Kaltwasser	+	+	+	0,16	Ellagsäure
	Kaltwasser	++	++	++	0,88	Protocatechu-S.
	Heißwasser	0	+	+	0,14	Ellagsäure
	Heißwasser	+	+	+	0,42	Rutin
<i>Aesculus hippocast.</i>	Kaltwasser	++	++	++	0,86	Protocatechu-S.
	Kaltwasser	+	+	+-	0,51	Aesculin
	Kaltwasser	0	+	+	0,70	Quercetin
<i>Carpinus betulus</i>	Kaltwasser	+	+	+	0,17	Ellagsäure
	Kaltwasser	-	-	--	0,68	Gallussäure
	Kaltwasser	+	+	++	0,86	Protocatechu-S.
<i>Fraxinus excelsior</i>	Kaltwasser	+	+	+	0,43	Rutin

Blattart	Extr.-Meth.	Einwirkung n.Std. Rf-W.			Inhaltsstoff
		24	48	72	
Betula alba	Kaltwasser	+	+	+	0,40 Rutin
	Kaltwasser	+	-	-	0,91 Brenzkatechin
	Kaltwasser	0	0	+	0,77 Quercetin
	Kaltwasser	-	-	-	0,79 Quercitrin
Salix alba	Kaltwasser	0	0	+	0,20 Ellagsäure ?
	Kaltwasser	-	-	-	0,61 Gallussäure
	Kaltwasser	+	+	++	0,86 Protocatechu-S.
	Kaltwasser	-	-	-	0,91 Brenzkatechin
Sorbus aria	Kaltwasser	+	+	+	0,15 Ellagsäure
	Kaltwasser	-	-	-	0,57 Gallussäure
	Kaltwasser	+	+	+	0,44 Rutin
Tilia cordata	Kaltwasser	+	+	+	0,85 Protocatechu-S.
Acer pseudoplat. (Meyr.)	Kaltwasser	0	+	+	0,80 Protocatechu-S.
	Kaltwasser	-	-	-	0,56 Gallussäure
	Kaltwasser	0	+	+	0,17 Ellagsäure
	Kaltwasser	+	+	+-	0,46 Rutin
	Kaltwasser	0	+	+-	0,51 Aesculin

Bezeichnungen siehe S.13

Die Tabelle zeigt folgende allgemeine Erscheinungen:

- Für phenolische Stoffe bei ca 0,1 %
 - hemmende Wirkung: Gallussäure, Brenzkatechin;
 - fördernde Wirkung: Ellagsäure, Protocatechusäure;
- für flavonoide Stoffe bei ca 0,1 %
 - hemmende Wirkung: Quercitrin;
 - fördernde Wirkung: Rutin, Quercetin;
- für Pyronglucoside bei ca 0,1 %
nach anfänglicher Förderung starke Melaninbildung und
schwache Hemmung.

Eine anschließende Prüfung auf die nicht in den Agar diffundierten Stoffe ergab, daß mit Ausnahme von Ellagsäure die Diffusion phenolischer Stoffe weit vollständiger war als die der flavonoiden. Die im Agar auftretenden Konzentrationen waren damit bei Flavonolen geringer als bei Phenolen.

Die Ergebnisse dieser Versuche boten einen ersten Anhaltspunkt für spätere Untersuchungen über die Beeinflussung der Atmungsintensität von Azotobakter bei Einwirkung der Stoffe.

2. Glasplattentest

Die Ergebnisse des Glasplattentestes deckten sich mit denen des Auflegens von Chromatogrammausschnitten.

Oben genannte Verfahren fanden auch zur Prüfung der aus dem chemischen Trennungsgang erhaltenen Fraktionen auf Inhaltsstoffe Anwendung. Sie eigneten sich dafür besonders, da die Fraktionen die Inhaltsstoffe angereichert enthielten.

Als Ergebnis konnten wir bei acht auf diese Weise geprüften Blattauszügen feststellen, daß folgende Stoffe in den einzelnen Fraktionen regelmäßig auftraten und als Einzelstoffe für die Gesamtreaktion der Fraktion ausschlaggebend waren (Trennungsgang l b).

1. Basen :

chromatographiert auf S. & S. 2043 b
in Butanol - Eisessig - Wasser; 4 : 1 : 5;

identifizierte Stoffe:
Histamin, Glucosamin;

Reaktion:

- a) Azotobacter chroococcum beider Stämme:
mittelstarke Hemmung;
- b) Azotobacter agile:
starke Hemmung

2. Säuren :

chromatographiert auf S. & S. 2043 b
in Phenol - Wasser-HCOOH;
auftretende Flecken konnten nicht identifiziert werden.

Reaktion :

- a) Azotobacter chroococcum beider Stämme:
normal
- b) Azotobacter agile:
schwache Hemmung

3. Bikarbonatlösung auf Säuren

chromatographiert auf S.& S.2043 b
in Phenol - Wasser HCOOH;

identifizierte Stoffe:
Adipinsäure, Glutarsäure;

Reaktion:

- a) Azotobacter chroococcum beider Stämme:
schwache Förderung, anschließend starke Hemmzone
- b) Azotobacter agile:
starke Hemmung

4. aromatische Säuren (carbo - cyclische Verbindungen): = Fraktion Säuren, zwei- und mehrwertige Phenole

chromatographiert auf S.& S.2043 b in
Butanol - Eisessig - Wasser; 4 : 1 : .5

identifizierte Stoffe:
Phloroglucin, Protocatechusäure, Brenzcatechin,
Gallussäure,
ev. Hydrochinon;

Reaktion:

- a) Azotobacter chroococcum beider Stämme:
starke Hemmung mit anschließender Förderung
- b) Azotobacter agile:
starke Hemmung

5. Auszug - Bodensatz (nach 48-stündigem Stehen im Eisschrank):

chromatographiert auf S.& S.2043 b
in Essigester - Ameisensäure - Wasser; 10 : 2 : 3

identifizierte Stoffe:
Rutin, Quercetin,

Reaktion (nach Lösen im Basischen, pH 7,2):

- a) Azotobacter chroococcum beider Stämme:
in starker Verdünnung: schwach fördernd;
in schwacher Verdünnung: schwach hemmend;
- b) Azotobacter agile:
in starker Verdünnung: mittelstark fördernd;
in schwacher Verdünnung: schwach fördernd;

6. Hydroxylverbindungen:

chromatographiert auf S.& S.2043 b
in Essigester - Ameisensäure - Wasser; 10 : 2 : 3;
in Butanol - Eisessig - Wasser; 4 : 1 : 5;

identifizierte Stoffe:
Quercitrin; daneben unter 5. nicht ausgefälltes
Rutin und Quercetin;

Reaktion:

s.o. unter 5.

Die Fraktionen des chemischen Trennungsganges zeigen,

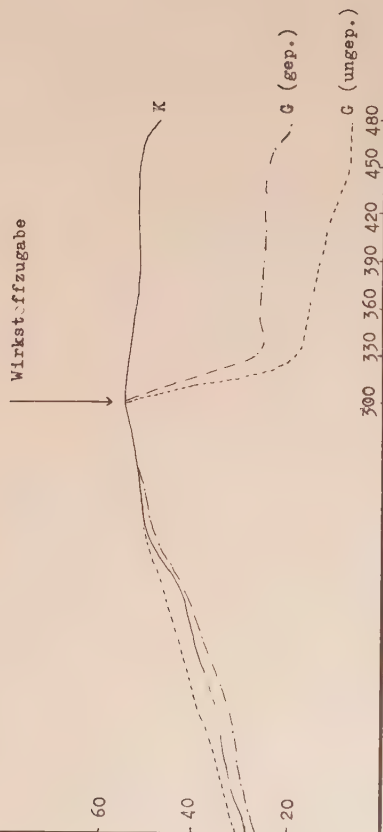
1. daß hemmende Wirkungen der Blattauszüge auf Azotobakter durch Basen, aliphatische und aromatische Säuren bedingt sein können,
2. daß Azotobakter agile auf diese Inhaltsstoffe im allgemeinen stärker anspricht als Azotobakter chroococcum.
Diese Erscheinung konnte im Diffusions - (Lochtest -)
Verfahren nicht festgestellt werden (vergl. Tab. II, S. 17).

3. Warburg - Atmungsmessungen

Die Ergebnisse des Plattentestes bildeten die Voraussetzung für die folgenden Untersuchungen über die Wirkung bei Zugabe dieser Stoffe auf die Atmungsintensität der Bakterien im Warburg - Apparat. Es soll zunächst die Wirkung phenolischer Stoffe in höherer Konzentration wiedergegeben werden. Tabelle IX bringt die Atmungs-differenzen nach Zugabe der Stoffe in einer Konzentration von 0,1 % und 0,2 % im Vergleich zur Kontrolle. Es wurden dabei die aus den Chromatogrammen herausgelösten Stoffe in ihrer Wirkung mit der gleichen Menge Reinsubstanz geprüft. Wir verwendeten ungepufferte und gepufferte Stoffe. Bei ersteren wurde das zur Trockene eingedampfte Eluat bzw. die Reinsubstanz mit einer festgelegten Menge Wasser aufgenommen; bei letzteren geschah die Aufnahme mit Phosphatpuffer, sodaß der pH - Wert der gelösten Stoffe 7,0 betrug. Dieser pH - Wert entsprach dem der Bakteriensuspension in Nährlösung, die für diese Versuche verwendet wurde.

Tab. IX Atmungs differenzen im Vergleich zur Kontrolle bei Einwirkung phenolischer Stoffe in einer Konzentration von 0,1 % und 0,2 %

Inhaltsstoff	conc.	Bakterienstamm	pH-Wert	Atmungs differenzen z. Kontr. in μ l in 6 Stunden	
Gallussäure	0,2 %	Azotobacter chroococcum	7,0 3,9	gepuffert:	- 243
		ATCC 4412		ungepuffert:	- 168
" "	0,2 %	Azotobacter agile	7,0 3,9	gepuffert:	- 314
				ungepuffert:	- 253
" "	0,1 %	A. chroococcum	7,0	gepuffert:	- 231
		ATCC 4412	4,0	ungepuffert:	- 133
" "	0,1 %	Azotobacter agile	7,0 4,0	gepuffert:	- 271
				ungepuffert:	- 217
Protocatechu- säure	0,2 %	A. chroococcum	7,0	gepuffert:	- 8
		ATCC 4412	3,5	ungepuffert:	- 348
" "	0,2 %	Azotobacter agile	7,0 3,5	gepuffert:	- 39
				ungepuffert:	- 154
" "	0,1 %	A. chroococcum	7,0	gepuffert:	+ 77
		ATCC 4412	3,8	ungepuffert:	+ 45
" "	0,1 %	Azotobacter agile	7,0 3,8	gepuffert:	+ 28
				ungepuffert:	+ 20
Phloroglucin	0,2 %	A. chroococcum	7,0	gepuffert:	- 38
		ATCC 4412	5,3	ungepuffert:	- 63
" "	0,2 %	Azotobacter agile	7,0 5,3	gepuffert:	- 52
				ungepuffert:	- 69
" "	0,1 %	A. chroococcum	7,0	gepuffert:	- 17
		ATCC 4412	5,4	ungepuffert:	- 27
" "	0,1 %	Azotobacter agile	7,0 5,4	gepuffert:	- 19
				ungepuffert:	- 26
Ellagsäure	0,2 %	A. chroococcum	7,0	gepuffert:	+ 1
		ATCC 4412	5,2	ungepuffert:	- 5
" "	0,2 %	Azotobacter agile	7,0 5,2	gepuffert:	+ 13
				ungepuffert:	+ 1
" "	0,1 %	A. chroococcum	7,0	gepuffert:	+ 2
		ATCC 4412	5,3	ungepuffert:	+ 14
" "	0,1 %	Azotobacter agile	7,0 5,3	gepuffert:	+ 32
				ungepuffert:	+ 18



Warburg-Atmungsmessungen
Azotobakter chroococcum

Stamm: ATCC 4412

Wirkstoff: Gallussäure 0,2 %

K=Kontrolle

G (gep.)=gepufferte Gallussäure

G (ungep.)=ungepufferte Gall.-S.

Minuten

Abb. 8

ml verbraucht. O_2

Wirkstoffzugabe

80

60

40

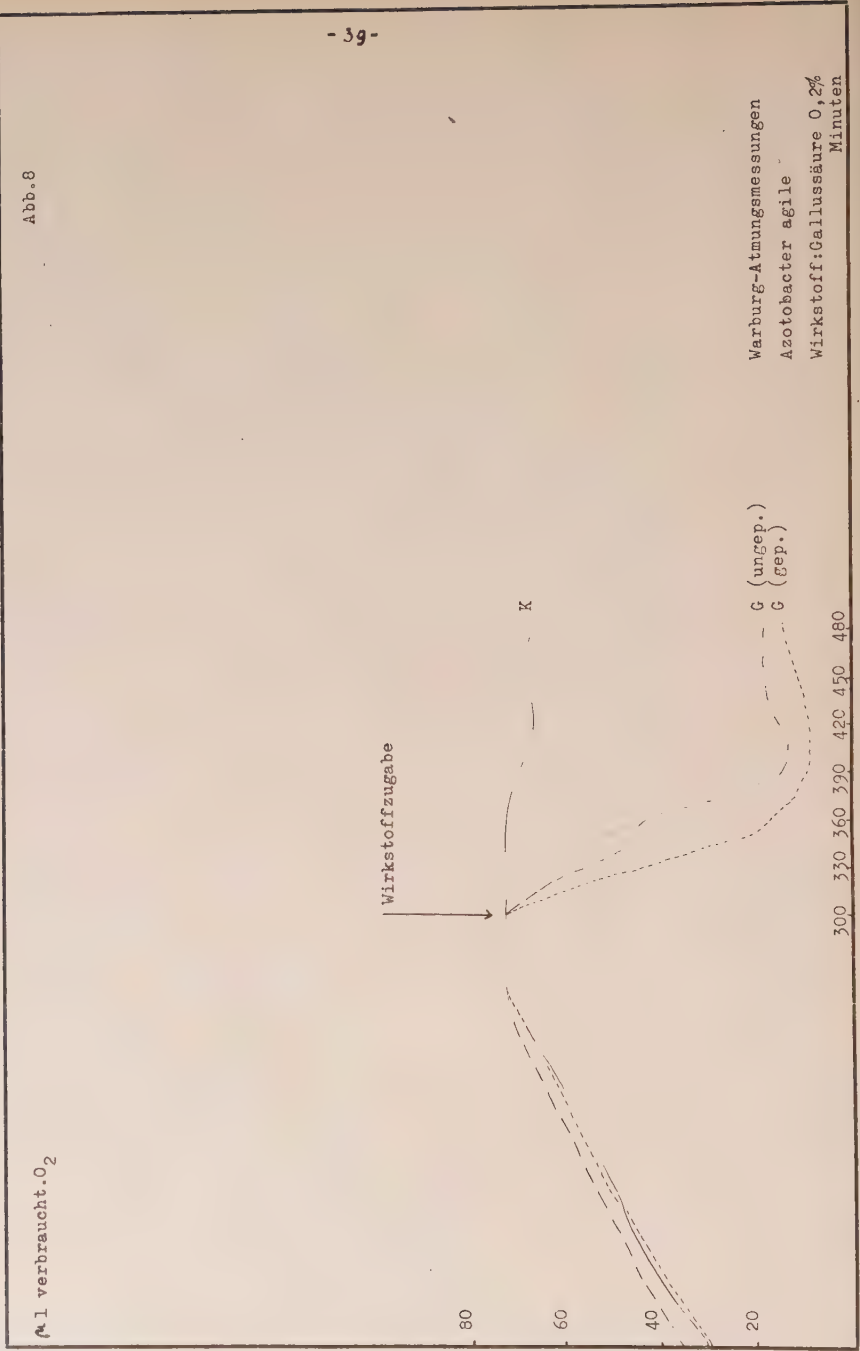
20

K

G (ungep.)
G (gep.)

300 330 360 390 420 450 480

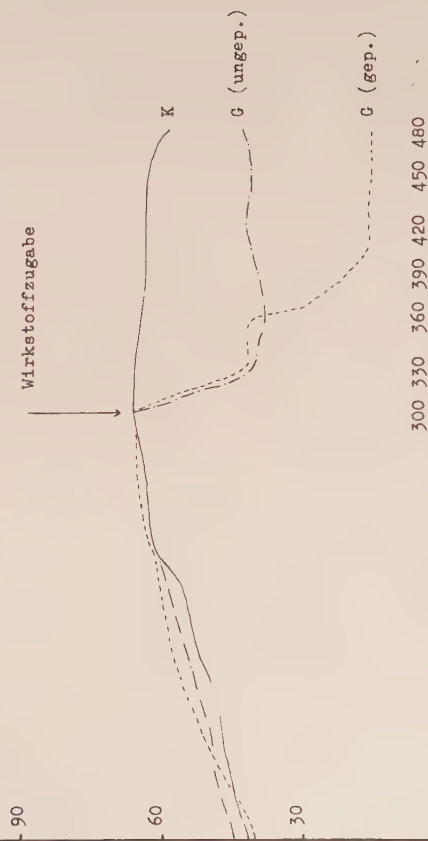
Warburg-Atmungsmessungen
Azotobacter agilis
Wirkstoff: Gallussäure 0,2%
Minuten



μl verbraucht. O_2

Abb. 9

- 40 -



Warburg-Atmungsmessungen
Azotobakter chroococcum
Stamm: ATCC 4412
Wirkstoff: Gallussäure O_2

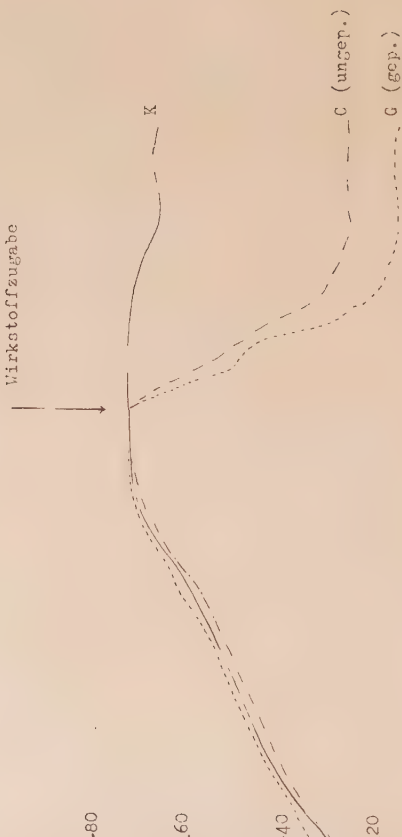
Minuten

ml verbraucht. O_2

Abb. 10

-44-

Wirkstoffzugabe



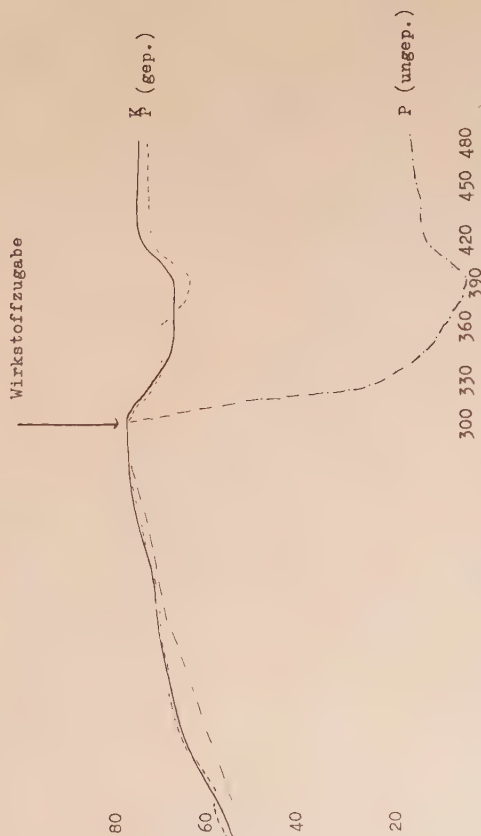
Warburg-Atmungsmessungen
Azotobacter agilis
Wirkstoff: Gallussäure 0,1 %

300 330 360 390 420 450 480

Minuten

μl verbraucht. O_2

Abb. 11



Warburg-Atmungsmessungen
Azotobacter chroococcum
Stamm: ATCC 4412
Wirkstoff: Protocatechu-
säure 0,2%

ml verbraucht. O_2

Abb. 12

-43-

Wirkstoffzugabe

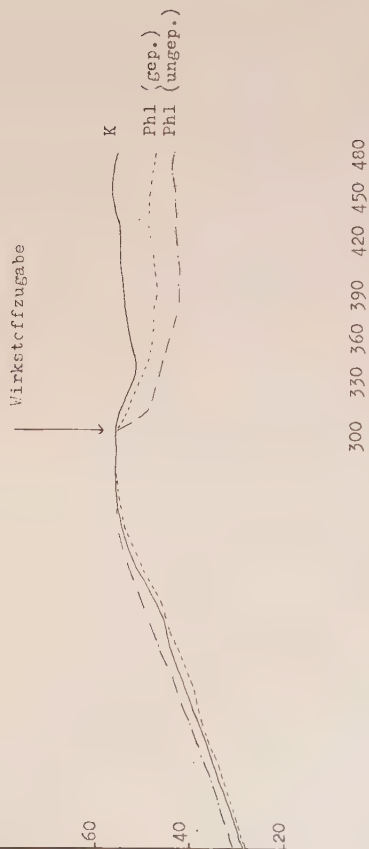


Warburg-Atmungsmessungen
Azotobacter agilis
Wirkstoff: Protocatechinsäure 0,2%

Minuten

ml verbraucht. O₂

Abb. 13



Warburg-Atmungsmessungen

Azotobacter chroococcum

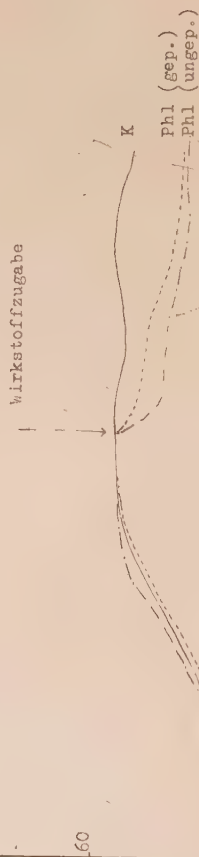
Stamm: ATCC 4412

Wirkstoff: Phloroglucin 0,2%

ml verbraucht. O_2

Abb. 14

-45-



Wartungs-Atmungsmessungen

Azotobacter agile

Wirkstoff: Phloroglucin 0,2%

300 330 360 390 420 450 480

Minuten

Die Besprechung der Ergebnisse soll unter zwei Gesichtspunkten durchgeführt werden:

1. Atmungsintensität und chemische Konstitution einwirkender Stoffe;
2. Dissoziationsgrad und biologische Wirkung;

Die Konstitution einer chemischen Verbindung ist oft für ihre biologische Wirkung ausschlaggebend. Ähnlich gebaute Stoffe rufen deshalb meist ähnliche biologische Wirkungen an ein- und demselben Organismus hervor, wenn diese nicht durch Verdrängungserscheinungen im antagonistischen Sinn verschoben werden.

Die phenolischen Stoffe unserer Versuche unterschieden sich durch verschiedene Anzahl von Kohlenstoff-Atomen, Hydroxylgruppen und Karboxylgruppen.

W.A. Sexton macht die Einführung oder Abtrennung solcher Atome und Gruppen in seinem Buch über „Chemische Konstitution und biologische Wirkung“ für eine Anzahl biologischer Effekte verantwortlich. Wir verglichen zunächst die Ergebnisse der Atmungsmessungen mit der Anzahl der Kohlenstoff-Atome der Substanzen. Dabei konnten wir folgende Abhängigkeit feststellen:

1. Verbindungen mit 6 Kohlenstoff-Atomen (Gallussäure, Phloroglucin) wirken in der Regel stark hemmend;
2. Verbindungen mit 14 Kohlenstoff-Atomen wirken zumeist fördernd (Ellagsäure).

Es nimmt danach die hemmende Wirkung phenolischer Stoffe mit steigender Anzahl der Kohlenstoff-Atome im Molekül ab.

Die Ursache hierfür könnte, besonders bei ungepufferten Ansätzen, die Abnahme der Säurewirkung sein.

Auch Größe und Gestalt der Moleküle sind begrenzende Faktoren beim Eindringen in Plasma-Grenzschichten. Sie bestimmen nicht nur die Diffusionsgeschwindigkeit, sondern die Möglichkeit einer Permeation überhaupt. Es wird deshalb mit zunehmender Molekülgröße die Menge eindringender Stoffe geringer sein. Da aber niedere Konzentrationen eher fördernde Wirkungen zeigen, könnte der fördernde Einfluß mit zunehmender Anzahl von Kohlenstoff-Atomen bei unseren Versuchen damit seine Erklärung finden, daß weniger Moleküle in die Bakterienzelle eindringen können. Besonders deutlich zeigt sich dies bei einem Vergleich der Wirkungen von Gallus- und Ellagsäure unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Ellagsäure doppelte Molekülgröße

gegenüber Gallussäure aufweist.

Mit zunehmender Zahl der Kohlenstoff-Atome nimmt die Wasserlöslichkeit der Substanz im Medium ab. Demgegenüber nimmt die Lipoidlöslichkeit von Stoffen mit steigender Anzahl von Kohlenstoff-Atomen zu. Da die Plasmagrenzschicht aus hydro- und lipophilen Bezirken besteht, kann dies für das Eindringen von Bedeutung sein. Eine charakteristische Eigenart der Phenole ist der Besitz von Hydroxylgruppen. Wir verglichen die Wirkung phenolischer Stoffe mit der Stellung der Hydroxylgruppen.

Die Hydroxylgruppen besitzen sauren Charakter. Auf dieser Eigenschaft beruht ihre Fähigkeit, sich mit den basischen Gruppen der Proteine zu verbinden. Das führt zur Denaturierung der Proteine und äußert sich in der toxischen Wirkung der Phenole.

Für die physiko-chemischen Wirkungen ist auch die Stellung der Hydroxylgruppen maßgebend. Die polare Hydroxylgruppe der Phenole besitzt eine Affinität zum Wasser, was die Reaktionsfreudigkeit der Moleküle erhöht. Freudenberg („Organische Chemie“) gibt an, daß Kernwasserstoffatome durch Einlagerung von Hydroxyl in o- und p-Stellung reaktionsfähig werden. Das zeigt auch ein Vergleich von Brenzcatechin und Resorcin. Brenzcatechin als o-Dioxybenzol wirkt auf Azotobakter in höheren Konzentrationen hemmend, während Resorcin in gleichen Konzentrationen nur schwach hemmende Wirkungen aufweist, was mit der m-Stellung seiner Hydroxylgruppen im Zusammenhang stehen mag.

Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt die hier verwendeten phenolischen Stoffe in ihrem Aufbau und der Wirkung, so kann folgendes festgestellt werden:

Gallussäure ist eine Trioxybenzoesäure. Die Substitution des Benzolringes erfolgt in m- und p-Stellung. Die polaren Gruppen sind an der Grenzfläche zum Wasser orientiert. Das -CONH- Gerüst der Proteine liegt direkt unter der Grenzfläche. Die Lage der polaren Gruppen der Gallussäure und des Proteingerüsts der Bakterienzellen erleichtert so eine Reaktion des Wirkstoffes mit den Proteinen.

Diese Betrachtungsweise beruht auf den Anschauungen von Danielli, der folgende Struktur der Zellgrenzschicht annimmt.

Nach Danielli, zitiert aus Sexton S. 72 „... sind die Lipoidmolekeln in parallelen Reihen angeordnet, bei denen die lipophilen

Teile einander zugewandt sind und die polaren Gruppen auf beiden Seiten eine zusammenhängende äußere Schicht bilden. Die polaren Gruppen werden durch Adsorptionskräfte (wahrscheinlich durch Wasserstoffbindungen) an lange Proteinketten gebunden. Sie sind sozusagen aneinander geklammert, wodurch die Struktur ihre mechanische Festigkeit erhält. Die Membran besitzt somit Grenzflächen aus Protein, welche die polaren Gruppen paralleler Reihen von Lipoidmolekeln bedecken. Diese Auffassung ist eine Modifikation der ursprünglichen Vorstellung Overtons. Solche Membranen haben eine Dicke von wahrscheinlich nur wenigen Molekeln. Noch andere besondere Schichten grenzen sie von der Hauptmasse des Cytoplasmas auf der Innenseite oder der umgebenden Flüssigkeit auf der Außenseite ab".

Die Anschauungen Overtons fanden in der Lipoidfiltertheorie von Collander und Bärlund (1926) eine Ergänzung. Sie deuteten die Erfahrung des Durchdringens großmolekularer Stoffe durch sehr engporige Filter, wenn sie in der Filtersubstanz selbst löslich sind. Daraus entwickelten sie die Hypothese, nach der die Plasmahaut ein dichtes Filter aus Lipoidstoffen mit hydrophilen Poren ist. Großmolekulare lipophile Stoffe könnten demnach über diese Lipoidbezirke in die Zelle eindringen.

Eine neue Fassung der Ruhland'schen Ultrafiltertheorie (Ruhland und Heilmann 1951) erklärt die Permeation lipophiler Substanzen. Bei ihnen führt die apolare Struktur zu einer Verringerung der „ zwischenmolekularen Kräfte ", während bei hydrophilen Stoffen die polare Molekülstruktur vorherrschend ist. Stoffe mit polaren Gruppen aber unterliegen stärkeren Adhäsionskräften als solche mit apolaren, wenn sie die Plasmagrenzschicht passieren wollen. Für die Plasmagrenzschicht wird auch hier angenommen, daß sie aus einem äußeren Teil mit eingelagerten Lipoiden und einer Binnenstruktur aus Proteinen besteht. Letztere enthält polare Gruppen, die mit polaren Molekülen reagieren können.

Das Vorhandensein mehrerer Hydroxylgruppen erhöht die Hydrophilie und Löslichkeit, was die Reaktionsfreudigkeit günstig beeinflusst. Andererseits aber wird dadurch die Orientierung an den Grenzflächen beeinflusst (Sexton S.258).

Diese könnte auch Ursache des schwächer hemmenden Einflusses von

Phloroglucin gegenüber Gallussäure sein. Phloroglucin besitzt drei Hydroxylgruppen in m - Stellung.

Protocatechusäure trägt als 1,2 - Dioxybenzoesäure seine Hydroxylgruppen in m - und p - Stellung, was seine erhöhte Reaktionsfreudigkeit bedingt.

Bei Ellagsäure könnte die Größe der Molekel, die aus zwei Teilen Gallussäure zusammengesetzt sind, mit Ursache der geringeren Reaktionsfreudigkeit sein. Die Stabilität des Laktonringes ist ebenfalls ein Kriterium für die geringe Wirksamkeit dieser Säure.

Die Ergebnisse der Wirkung mehr oder minder dissoziierter bzw. undissoziierter phenolischer Stoffe in höheren Konzentrationen auf Azotobakter sind aus Tab. IX zu ersehen.

Zu ihrem Verständnis sei folgendes angeführt:

In einer Verbindung ArOH ist das an den Sauerstoff gebundene Wasserstoffatom imstande, elektrolytisch abzusoziiieren:

$\text{Ar OH} \rightleftharpoons \text{Ar O}^- + \text{H}^+$. Eine wässrige Lösung phenolischer Stoffe enthält mehr Wasserstoffion als Wasser allein. Sie reagiert deshalb sauer. Für cyclische Carbonsäuren ist eine Steigerung der Dissoziation anzunehmen, die durch die Carboxylgruppe bewirkt wird. Die Dissoziationskonstante phenolischer Stoffe liegt in der Größenordnung von 10^{-10} (aus Hollemann - Richter "Lehrbuch der organischen Chemie", S. 312, 1954).

Die Wirkung der in Wasser gelösten Stoffe wurde in Tab. IX unter der Bezeichnung „ungepuffert“ angegeben. Bei ihnen überwiegt der Anteil undissoziierter Moleküle. Die Wirkung der in Phosphatpuffer gelösten Stoffe erhielt die Bezeichnung „gepuffert“. Bei ihnen ist die Dissoziation größer als in ungepufferten, die Molekül - Konzentration geringer.

Für die Wirkung phenolischer Stoffe ist ihre Reaktion mit den Bakterien-Proteinen maßgebend.

Jirgensons und Straumanis (1948) beschreiben die Reaktion zwischen einem Protein und einer Säure. Sie geben an, daß bei Zugabe einer verdünnten Säure zu einem Proteinsol die Wasserstoffionenkonzentration geringer wird als bei Zugabe zu demselben Volumen

Wasser. Zum entsprechenden Ergebnis kamen sie bei Behandlung von Proteinsolen mit Lauge, wobei die Hydroxylionenkonzentration abnahm. Proteine können danach sowohl H^+ wie OH^- binden. Ursache dafür kann eine Adsorption von H^+ und OH^- an die Proteinteilchen sein oder auch die Folge der Reaktion mit den aktiven Gruppen der Proteinmoleküle. (Pufferwirkung der Eiweißstoffe).

G.E. Briggs (1955) untersuchte die Beziehungen zwischen der H^+ - Ionenkonzentration auf die Atmungsintensität. Er fand drei Wirkungsmöglichkeiten der Beeinflussung des Stoffwechsels in der Zelle durch eine schwache Säure HA:

- a) nur die Moleküle HA verbinden sich mit der zelleigenen Substanz x;
- b) sowohl die Moleküle HA wie die Ionen A^- verbinden sich mit x, aber nur x HA ist inaktiv;
- c) wie b, aber sowohl xHA wie xA sind inaktiv.

Wird bei einer bestimmten Menge HA durch Erhöhung des pH-Wertes A^- vermehrt, dann weist eine Konstanz des Hemmungseffektes auf die Möglichkeit a .

Wird der Hemmungseffekt durch die gleiche Maßnahme herabgesetzt, dann kann mit der Möglichkeit b gerechnet werden.

Die Möglichkeit c liegt vor, wenn der Hemmungseffekt dadurch erhöht wird, weil die Gesamtheit von xHA und xA vermehrt wird.

D.A. Haydon (1956) verglich die bactericide Wirkung von Phenol auf Bac. coli in verschiedenen Konzentrationen und bei gleichzeitiger Gabe verschiedener Salzlösungen. Er konnte dabei die Abhängigkeit des Wirkungsmechanismus des Phenols von der Salzkonzentration feststellen. Die Schädigung der Bakterien war bei Zugabe der Salzlösungen geringer, das Phenol konnte demnach weniger auf die Bakterien wirken. Der Verfasser erklärt diese Erscheinung mit dem Aufbau der Bakteriengrenzschicht. Sie besteht aus einem Netzwerk von Makromolekülen. Dieses wird durch niedrige Salzkonzentrationen ausgedehnt. Bei höherer Salzkonzentration kontrahieren sich die Maschen des Netzwerkes. In ersterem Fall können die Phenolmoleküle eindringen und eine irreversible Schädigung der Bakterienzelle hervorrufen. Im zweiten Fall wird ihr Eindringen erschwert, so daß die Zellschädigung geringer ist.

Für die Erklärung unserer Versuchsergebnisse ergäbe sich daraus folgendes:

Protocatechusäure, Phloroglucin und Ellagsäure wirken bei Zugabe in wässriger Lösung stärker als in Pufferlösung. Der Einfluß undissoziierter Moleküle dürfte hier überwiegen, da ihre wässrigen Lösungen nur zu einem geringen Teil dissoziiert sind. Es zeigt sich darin, in Übereinstimmung mit den Anschauungen Jirgensons und Straumanis, die stärkere Wirksamkeit undissoziierter Stoffe gegenüber dissoziierten.

Die Pufferung der Stoffe führt zu einer Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration und gleichzeitiger Vermehrung des Anionenanteils. Bei vollkommen gelösten Stoffen ist damit eine Verminderung des molekular gelösten Anteils verbunden (Protocatechusäure, Phloroglucin). Die Abnahme des Hemmungseffektes könnte dadurch erklärt werden. Bei zunächst nicht völlig gelösten Stoffen (Ellagsäure) ist mit zunehmender Dissoziation ein Übergang aus dem unlöslichen Anteil in die molekular gelöste Form denkbar. Dadurch würde der wirksame molekular gelöste Anteil konstant gehalten. Die Abnahme des Hemmungseffektes könnte hier mit der Möglichkeit der Angaben von Briggs erklärt werden.

Gallussäure wirkt in wässriger Lösung schwächer hemmend als in Pufferlösung. Sie unterscheidet sich darin von den anderen oben genannten phenolischen Stoffen. Eine eindeutige Erklärung konnte dafür zunächst nicht gefunden werden.

Auf Azotobacter agile wirken obengenannte Stoffe stärker hemmend als auf Azotobacter chroococcum (ATCC 4412). Bei Zugabe ungepufferter Wirkstofflösungen traten diese Unterschiede im allgemeinen stärker hervor. Diese Erscheinung könnte nach den Anschauungen D.A. Haydons ihre Erklärung finden.

Die Wirkung der Stoffe in geringeren Konzentrationen ist aus Tab.X zu ersehen.

Tab.X Atmungs-differenzen im Vergleich zur Kontrolle bei Einwirkung phenolischer Stoffe in geringeren Konzentrationen

Inhaltsstoff	conc.	Bakterienstamm	pH-W.	Atmungs-differenzen z. Kontrolle in µl in 3 Stunden	
Gallussäure	0,01	% A.chroococcum	7,0	gepuffert:	+16
		ATCC 4412	5,2	ungepuffert:	+34
"	"	0,01 % Azotobacter	7,0	gepuffert:	-45
		agile	5,2	ungepuffert:	- 6
"	"	0,001 % A.chroococcum	7,0	gepuffert:	+31
		ATCC 4412	5,2	ungepuffert:	+59
"	"	0,001 % Azotobacter	7,0	gepuffert:	- 5
		agile	5,2	ungepuffert:	+12
"	"	0,0001 % A.chroococcum	7,0	gepuffert:	+ 9
		ATCC 4412	5,3	ungepuffert:	+38
"	"	0,0001 % Azotobacter	7,0	gepuffert:	+34
		agile	5,3	ungepuffert:	+46
"	"	0,00001% A.chroococcum	7,0	gepuffert:	+14
		ATCC 4412	5,4	ungepuffert:	+15
"	"	0,00001% Azotobacter	7,0	gepuffert:	+36
		agile	5,4	ungepuffert:	+38
Protocatechusäure	0,01	% A.chroococcum	7,0	gepuffert:	+52
		ATCC 4412	4,0	ungepuffert:	+64
"	"	0,01 % Azotobacter	7,0	gepuffert:	+38
		agile	4,0	ungepuffert:	+23
Phloro-glucin	0,01	% A.chroococcum	7,0	gepuffert:	- 5
		ATCC 4412	5,5	ungepuffert:	-17
"	0,01	% Azotobacter	7,0	gepuffert:	-10
		agile	5,5	ungepuffert:	-24
Ellagsäure	0,01	% A.chroococcum	7,0	gepuffert:	+22
		ATCC 4412	5,0	ungepuffert:	+14
"	"	0,01 % Azotobacter	7,0	gepuffert:	+44
		agile	5,0	ungepuffert:	+27

In niederen Konzentrationen wirken phenolische Stoffe in der Regel fördernd. Bei Protocatechusäure tritt bereits bei 0,1 % eine fördernde Wirkung auf (Tab.IX), nur Phloroglucin wirkt auch noch bei 0,01 % schwach hemmend.

Mayer (1958) beschrieb die Verwertung aromatischer Stoffe durch aerobe Bakterien. Danach sind diese zur Spaltung des aromatischen Ringes befähigt, wobei die einzelnen Komponenten für den eigenen Stoffwechselprozeß nutzbar gemacht werden. Das Kohlenstoffgerüst des Substrates wird dabei ausschließlich in Kohlendioxyd und Zellmaterial umgesetzt.

Es ist anzunehmen, daß die bei unseren Versuchen verwendeten phenolischen Stoffe in niederen Konzentrationen von den Bakterien ebenfalls für den eigenen Stoffwechsel nutzbar gemacht wurden, zumal es Azotobakterstämme gibt, die Benzoat als Kohlenstoffquelle verwerten. (vergl. Schlüter-Bukatsch).

Einwirkung flavonoider Stoffe auf Azotobakter

Neben den phenolischen Stoffen interessierten uns flavonoide Substanzen in ihrer Einwirkung auf Azotobacter chroococcum beider Stämme und auf Azotobacter agile. Die Stoffe traten auf den Chromatogrammen häufig auf.

Die Wirkung dieser Stoffe wurde nach Vorprüfung im Plattentestverfahren durch Messung der Atmungsintensität im Warburg-Apparat geprüft. Wir verwendeten die Substanzen dabei in einer Konzentration von 0,1 %. Die Atmungs differenzen im Vergleich zur Kontrolle waren hier weit geringer als bei den phenolischen Stoffen.

Die Wirkung flavonoider Substanzen auf Azotobakter soll nach folgenden Gesichtspunkten besprochen werden.

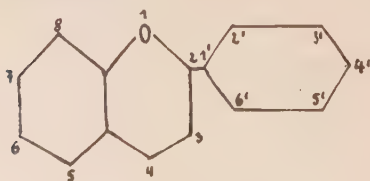
Konstitution und biologische Wirkung

Einfluß der Zuckerkomponente

Besonderheiten bei Azotobacter agile

Die ähnliche Konstitution der Flavonole untereinander bedingt eine weitgehende Übereinstimmung in der biologischen Wirkung.

Als ausschlaggebend für die Reaktionsfähigkeit der Flavonole muß die Stellung der Hydroxylgruppen angesehen werden. Nach Angaben von W. Mayer, zitiert aus Ruhland „Handbuch der Pflanzenphysiologie, Band 10“ sind Hydroxylgruppen in 7- und 4'-Stellung bei Flavonolen besonders reaktionsfähig. Die Bezeichnungen sind aus folgendem Schema zu ersehen:



In unseren Stoffen liegen folgende Hydroxylanordnungen vor:

<u>reaktionsstarke Gruppen</u>	<u>reaktionsschwache Gruppen</u>
Quercetin 4'; 7	3'; 5 ; 3
Rutin 4'; 7	5 ; 3'
Hyperosid 4'; 7	5 ; 3'
Quercitrin 4'; 7	5 ; 3'
Robinin 4'	5

Es sollen zunächst die Wirkungen oben genannter Stoffe auf *Azotobacter chroococcum* beider Stämme besprochen werden.

Nach der Hydroxylanordnung sind zwei Gruppen zu unterscheiden:

1. Quercetin, Rutin, Hyperosid und Quercitrin

mit stärker hemmender Wirkung;

2. Robinin

mit schwächer hemmender Wirkung

Beide Gruppen unterscheiden sich in ihrem Hydroxyl der 7 - Stellung. Es kann deshalb vermutet werden, daß das Fehlen dieser Hydroxylgruppe mit Ursache der schwächer hemmenden Wirkung ist. Außerdem unterscheiden sich die Stoffe in ihren Zuckerkomponenten, die aus folgender Übersicht ersichtlich sind:

Rutin = Quercetin + Rutinose (Glucose-Rhamnose) in 3 - Stellung;

Hyperosid = Quercetin + Galactose in 3 - Stellung

Quercitrin = Quercetin + Rhamnose in 3 - Stellung;

Robinin = Kämpferol + Robinobiose in 3 - Stellung
+ Rhamnose in 7 - Stellung

Eine Verwertung der Zuckerkomponente durch *Azotobacter chroococcum* beider Stämme konnte nur bei längerer Versuchsdauer festgestellt werden. Es darf angenommen werden, daß hierzu ein Verbrauch der in der Suspension enthaltenen Nährstoffe Voraussetzung ist.

Über die Bindung bzw. Verwertung der Stoffe durch *Azotobacter* wird später berichtet. Interessant ist hier die Tatsache, daß Robinin nach der Versuchsdauer in der zugegebenen Konzentration wieder nachgewiesen werden konnte, woraus sich ebenfalls die schwächer hemmende Wirkung dieses Stoffes auf *Azotobacter* erklären läßt.

Auffallend war bei unseren Versuchen die fördernde Wirkung der Flavonole auf *Azotobacter agile*. Die chromatographische Prüfung der Endprodukte nach Zugabe der Stoffe ergab in den meisten Fällen einen einheitlichen Stoff mit einem R_f - Wert von 0,55 - 0,57 und blauer Fluoreszenz; der bei den anderen Stämmen nicht festgestellt werden konnte. Es werden sich nach Zugabe der Flavonole bei *Azotobacter agile* deshalb andere Stoffwechselvorgänge abspielen als bei *Azotobacter chroococcum*.

Chromatographische Prüfung der verbliebenen Stoffe nach Einwirkung von Phenolen, Flavonolen und einem Cumarinderivat auf Azotobakter

Nachdem wir die Wirkung dieser Stoffe auf die Bakterien festgestellt hatten, interessierte uns die Frage, inwieweit Azotobakter diese abzubauen oder zu binden imstande ist.

Es wurde deshalb zunächst eine chromatographische Prüfung der verbliebenen Stoffe nach den Atmungsversuchen durchgeführt, und sie brachte interessante Ergebnisse.

Daraufhin setzten wir folgende Versuchsserie an:

Je 50 ml Bakteriensuspension in Nährlösung wurden mit Wirkstoff versetzt, sodaß die Gesamtkonzentration an Wirkstoff jeweils 0,2 % betrug. Die Suspensionen wurden 12 Stunden vor Zugabe der Substanzen bei 25 Grad Celsius bebrütet. Nach Zugabe der Wirkstoffe kamen sie 12 Stunden auf die Schüttelmaschine. Nach Ablauf des Versuches wurden die Bakterien abzentrifugiert. Zum chromatographischen Vergleich dienten wäßrige Lösungen der Wirkstoffe mit einer Konzentration von 0,2 %, deren pH-Wert dem der einzelnen Suspensionen entsprach.

Die Ergebnisse der chromatographischen Prüfung sind aus den Tabellen XI und XII zu ersehen.

Tab. XI Die Wirkung von Azotobakter auf phenolische Stoffe
in Nährlösung

a Azotobacter chroococcum, St. ATCC 4412, vergl. Darst. 15 und 18; 5.59 u. 60
b Azotobacter chroococcum, St. BA II, vergl. Darst. 16 und 19; 5.61 u. 62
c Azotobacter agile, vergl. Darst. 17 und 20; 5.63 u. 64

Wirkstoff	Reinsubstanz				nach Bakterieneinwirkung			
					abgebaut o. gebund.	neu auftretende Stoffe		
	Rf	UV	FeCl ₃	dSS [*]		Rf	UV	FeCl ₃ dSS [*]
a Gallus-säure	0,61	grau	grau-blau	gelb	ja	-	-	-
Phloro-glucin	0,68	grau	braun	rot	nein	-	-	-
Protocotechus.	0,81	grau-blau	blau-grün	braun	nein	-	-	-
Ellag-säure	0,11	viol.	-	-	ja	-	-	-
b Gallus-säure	0,57	grau	grau-blau	gelb	ja	0,18	grünlich	-
Phloro-glucin	0,70	grau	braun	rot	nein	-	-	-
Protocotechus.	0,80	grau-blau	blau-grün	braun	z.T.	0,90	-	blau-grau
Ellag-säure	0,12	viol.	-	-	ja	-	-	-
c Gallus-säure	0,59	grau	grau-blau	gelb	ja	-	-	-
Phloro-glucin	0,69	grau	braun	rot	nein	0,21	grau-blau	-
Protocotechus.	0,81	grau-blau	blau-grün	braun	ja	0,88	-	braun
Ellag-säure	0,10	viol.	-	-	ja	0,20	grau-blau	-
						0,30	viol.	-

Die violette Fluoreszenz von Ellagsäure veränderte sich schon nach kurzer Zeit (grünlich-schwarz).

* dSS = diazotierte Sulfanilsäure (Pauly's Reagens)

Tab. XII Die Wirkung von Azotobakter auf flavonoide Stoffe und Cumarinderivate in Nährlösung

a Azotobacter chroococcum, St. ATCC 4412, vergl. Darst. 21 und 22; 5.65 u. 46
 b Azotobacter agile, vergl. Darst. 23; 5.67

Wirkstoff Reinsubstanz nach Bakterieneinwirkung
 abgebaut
 o. gebund. neu auftretende Stoffe

	Rf	UV	AlCl ₃		Rf	UV	AlCl ₃
a Rutin	0,34	braun	braun	z.T.	0,18 0,40	braun braun	braun braun
Robinin	0,28	gelb	gelb- grün	nein	-	-	-
Kämphe- rol	0,80	gelb	gelb- grün	ja	0,53 0,85	hell- blau hell- blau	- -
Querce- tin	0,62	gelb	gelb- grün	ja	0,55	gelb	gelb- grün
Querci- trin	0,69	gelb- braun	gelb	z.T.	0,67	gelb	gelb
Hyper- osid	0,50	gelb- braun	braun	nein	-	-	-
Aes- culin	0,51	blau	-	ja	0,75	blau	-
b Rutin	0,49	braun	braun	z.T.	0,21	braun	braun
Kämphe- rol	0,98	gelb- grün	gelb- grün	z.T.	0,56	blau	-
Querce- tin	0,81	gelb	gelb- grün	ja	0,56	blau	-
Querci- trin	0,81	gelb- braun	gelb	z.T.	0,56	blau	-
Hyper- osid	0,65	braun	braun	nein	0,56	blau	-
Aes- culin	0,55	blau	-	ja	0,81	blau	-

Gallussäure konnte nach dem Versuch bei keinem Stamm mehr nachgewiesen werden.

Phloroglucin wurde nach Einwirkung auf Azotobakter bei allen Stämmen noch in der gleichen Konzentration festgestellt.

Protocatechusäure trat bei Azotobacter chroococcum, St. ATCC 4412, nach dem Versuch in fast gleicher Konzentration auf. Für Azotobacter chroococcum, St. BA II, und für Azotobacter agile muß ein teilweiser Abbau angenommen werden. Die chromatographische Prüfung eines hydrolysierten protocatechusäurehaltigen Blattauszuges zeigte dasselbe Abbauprodukt, das bei Einwirkung dieser Säure auf Azotobacter chroococcum (BA II) und Azotobacter agile auftrat.

Ellagsäure wurde nach dem Versuch bei keinem Stamm mehr nachgewiesen.

Da Gallussäure stark hemmende Wirkungen zeigte, ist es wahrscheinlich, daß der Stoff an die Bakterienzellen gebunden wurde, während wir für die schwach fördernd wirkende Ellagsäure einen Abbau des Stoffes annehmen.

Quercetin, Kämpherol und Aesculin traten nach dem Versuch mit Azotobacter chroococcum, St. ATCC 4412, auf den Chromatogrammen nicht mehr auf; dasselbe gilt für Azotobacter agile mit Ausnahme von Kämpherol, welches noch in geringerer Menge nachweisbar war.

Rutin und Quercitrin konnten auch nach der Einwirkung auf Azotobakter beider Stämme noch chromatographisch erfaßt werden, bei Rutin ca 50 %, bei Quercitrin ca 60 %. Der bei Rutin mit dem Rf-Wert 0,40 auftretende Stoff dürfte mit der Reinsubstanz identisch sein.

Robinin und Hyperosid konnten nach dem Versuch auf den Chromatogrammen in der gleichen Konzentration wie die Reinsubstanzen nachgewiesen werden.

Bei dem Versuch mit Aesculin wurde nach Einwirkung ein Stoff nachgewiesen, der im Rf-Wert und der Fluoreszenz mit Aesculetin übereinstimmt. Es würde sich dabei um eine Abspaltung der Zuckerkomponente handeln.

Da am Schluß der einzelnen Abschnitte bereits jeweils eine kurze Besprechung der Ergebnisse angefügt ist, kann hier auf eine ausführliche Diskussion verzichtet werden.

Es seien nur die wichtigsten Resultate abschließend kurz zusammengestellt.

Zusammenfassung:

1. Unter Anwendung der papierchromatographischen Methode wurden Kaltwasserauszüge trockener Herbstblätter einheimischer Laubbäume auf phenolische und flavonoide Inhaltsstoffe geprüft. Es wurden in der Hauptsache vier phenolische Stoffe, sechs flavonoide Stoffe und ein Cumarinderivat gefunden, identifiziert und die ungefähren Mengen festgestellt.
2. Es konnte eine Abhängigkeit des Gehaltes an Inhaltsstoffen vom Standort der Bäume und von der Dauer der Lagerung der Blätter vermerkt werden.
3. Als Testorganismen verwendeten wir *Azotobacter chroococcum* der Stämme ATCC 4412 und BA II (Bot.Inst.) und *Azotobacter agile* (Bot.Inst.).
4. Zur Feststellung der Wirkung der Gesamtauszüge bedienten wir uns des Lochtestverfahrens, des „Glasplattentestes“ und der Mikrostickstoffbestimmung nach Kjeldahl; die Wirkung der einzelnen Stoffe wurde außerdem unter Anwendung der Methode des Auflegens von Chromatogrammausschnitten und der Atmungsmessung im Warburg-Apparat geprüft. Beim Glasplattentest verwendeten wir zur Feststellung des Lebenszustandes der Bakterien und damit zur Wirkung der Stoffe Triphenyltetrazoliumchlorid.
5. Besonders eindeutig war der Einfluß der Stoffe in höheren Konzentrationen; 0,1 % und 0,2 % bei phenolischen Stoffen, 0,1 % bei flavonoiden Stoffen. Für phenolische Stoffe konnte durch Verwendung ungepufferter und gepufferter, d.h. weitgehend undissoziierter und dissoziierter Wirkstofflösungen der zumeist stärkere Einfluß molekular gelöster Wirkstoffe festgestellt werden. Diese Erscheinung wird mit Hilfe der Permeabilitätstheorien zu deuten versucht.
6. Phenolische Stoffe wirken auf *Azotobakter* wesentlich stärker als flavonoide Stoffe, was sich besonders in Atmungsversuchen deutlich äußerte.
7. Für flavonoide Stoffe konnte eine Abhängigkeit der Wirkung von der Zahl und Stellung der Hydroxylgruppen festgestellt werden.
8. *Azotobakter* veränderte zugesetzte Wirkstoffe unterschiedlich. Z.T. blieben sie völlig erhalten, z.T. wurden sie weitgehend ab- bzw. umgebaut oder gebunden. Gallussäure konnte bei allen Stämmen in keinem Fall mehr nachgewiesen werden, während Phloroglucin

nach der Einwirkung in unveränderter Form auf den Chromatogrammen erschien. Da Gallussäure die ausgesprochensten Hemmwirkungen zeigt, ist anzunehmen, daß sie besonders stark von den Zellen gebunden wird. Bei Aesculin konnte eine Abspaltung der Zuckerkomponente festgestellt werden.

9. Die drei Azotobakterstämme zeigten z.T. deutliche Unterschiede in ihrem physiologischen Verhalten, besonders deutlich waren diese zwischen *Azotobacter chroococcum* beider Spezies und *Azotobacter agile* (vergl. Schlüter-Bukatsch).
10. Die Kaltwasserextraktion von Fallaub entspricht im Prinzip der Auslaugung einer Laubstreudecke durch Niederschläge. Da *Azotobakter* als aerober Organismus besonders in oberflächlichen Bodenschichten auftritt, ist auch in der Natur eine Beeinflussung durch ausgewaschene Wirkstoffe anzunehmen. Allerdings sind wir uns bewußt, daß unter natürlichen Bedingungen weitaus verwickeltere Verhältnisse als *in vitro* vorliegen.

Herrn Prof. Dr. L. Brauner danke ich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit und deren Förderung; Herrn Prof. Dr. Bukatsch danke ich für die Themenstellung, stete Betreuung und viele wertvolle Hinweise.

Den Herren Professoren Dr. Hörhammer und Dr. Niemer verdanke ich die Überlassung von Testsubstanzen.

Literaturverzeichnis:

- Beloserski, A.N. und Proskurjakow, N.J., Praktikum der Biochemie der Pflanzen. S.120-122, S.376, Berlin (1956).
- Brauner, L., Einführung in die physikalische Chemie der Pflanzenzelle. Aus Handbuch der Biologie, Bd.I, Heft 7/8, S.171.
- Briggs, G.E., The relation between concentration of hydrogen ions and the effect of weak acids or basis of metabolic activity. J. of Exper. Bot. 5, 263-68 (1954). Ref. in Ber. wiss. Biol. 94 (1955).
- Bukatsch, F., Zur Analyse der Bakterienhemmstoffe aus der Wurzel von Schöllkraut und ähnlichen Pflanzen. Arch. Mikrobiol. 24, S.281-96 (1956).
- Ferenezy, C., Occurrence of antibacterial compounds in seeds and fruits. Ref. in Ber. wiss. Biol. 107 (1956).
- Freudenberg, K., Organische Chemie. S.73-78, S.168, Heidelberg (1950)
- Grümmer, G., Die gegenseitige Beeinflussung höherer Pflanzen - Allelopathie. S.47-69, Jena (1955).
- Hackl, H., Photometrische Studien über bakteriostatische Effekte. Arch. f. Hyg. 139, S.405-13 (1955).
- Hänsel, R. u. Hörhammer, L., Vergleichende Untersuchungen über die Flavonglucoside der Betulaceen. Arch. Pharm. 287, S.117-126 (1954).
- Harborne, J.B., Late stages in the biosynthesis of flavonoides. Biochem. J. 68, 12F-13P (1958). Ref. in Ber. wiss. Biol. 127, S.262 (1958).
- Haydon, D.A., Surface behaviour of Bact. coli II, the interaction with Phenol. Proc. Roy. Soc. (Lond.), Ser. B. 145, S.383-91 (1956).
- Hermann, K., Über die Flavonole und Phenole der Zwiebel (allium cepa). Arch. Pharm. 291, S.238-47 (1958).
- Höber, R., u. Mitarbeiter, Physical chemistry of cells and tissues. Philadelphia (1948).
- Hollemann-Richter, Lehrbuch der organischen Chemie. Berlin (1954). S.337, 346-349.
- Hollemann-Wiberg, Lehrbuch der anorganischen Chemie. Berlin (1955).
- Jirgensons-Straumanis, Kurzes Lehrbuch der Kolloidchemie. S.92-93, 335, London (1948).
- Karrer, P., u. Mitarbeiter, Lehrbuch der organischen Chemie. S.464-71, 502, 556-60, 568-82, 584-90, 591-95. Basel und Stuttgart (1958).
- Karrer, P., Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe (exclusive Alkaloide). Basel und Stuttgart (1958).
- Linskens, H.F., Papierchromatographie in der Botanik. 2. Auflage, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1959).

- Mayer, W., aus Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. X, S. 308-11, 354-85, 507-8, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1958).
- Melin, E., Symb. Bot. Upsal. 8, 3 (1946).
- Molisch, H., Über den Einfluß einer Pflanze auf die andere (Allelopathie). Forschungen und Fortschritte 13, Nr. 34, S. 407-408 (1937).
- Neu, R., und Mitarbeiter, Eine Methode zur Identifizierung papierchromatographisch aufgetrennter Flavone und ihrer Spaltprodukte, dargestellt am Kämpherol aus Aesculus hippocastanum. Naturw. 44, S. 10 (1957).
- Osborn, E. M., Brit. J. Exper. Path. 24, S. 227 (1943).
- Paech, K., Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. S. 154-64, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1950).
- Poschenrieder, H., und Mitarbeiter, Über den Einfluß von Kaustobio-
lithen auf den Stoffwechsel von Azotobacter chroo-
coccum. Zbl. Bacter. II, Abt. 109, S. 569-78 (1956).
- Rauen, H. M., Biochemisches Taschenbuch, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1956).
- Reznik, H., u. Urban, R., Naturwiss. 44, S. 13 (1957).
- Rippel-Baldes, Grundriß der Mikrobiologie. 3. Auflage, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1955).
- Roller, K., Z. Bot. 44, S. 477 (1956).
- Römpf, Chemie-Lexikon. 4. Auflage, Bd. I u. II, Stuttgart (1958).
- Salle, A. J., und Mitarbeiter, Fundamental principles of bacteriology. S. 59-87, 601-646, (1954).
- Schlüter, M., und Bukatsch, F., Physiologische Untersuchungen zur Rassenfrage von Azotobakter. Zbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene; II Abt., S. 112 (1959).
- Schmidt, O., u. Mayer, W., Natürliche Gerbstoffe. Angew. Chem. 68, S. 103-115 (1956).
- Schwabe, W., Aus unserer Arbeit. Karlsruhe (1956).
- Sexton, W. A., Chemische Konstitution und biologische Wirkung, S. 58-75, 88-101, 254-60, Weinheim/Bergstr. (1958).
- Staudinger, H., u. Kern, W., Anleitung zur organischen qualitativen Analyse. S. 152-61, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1955).
- Tauböck, K., Naturwiss. 30, S. 439, (1942).
- Wehmer, C., Die Pflanzenstoffe. 1. Bd. Jena (1929), 2. Bd. Jena (1931),
Ergänzungsband z. II. Aufl. unter Mitarbeit von
Hadders, M.
- Winter, A. G., u. Schönbeck, Fr. Naturwiss. 41, S. 145-46 (1954).
- Winter, A. G., u. Schönbeck, Naturwiss. 40, S. 168-69 (1953).
- Winter, A. G., u. Willeke, L., Naturwiss. 39, S. 190-91 (1952).
- Winter, A. G., u. Willeke, L., Naturwiss. 39, S. 45-46 (1952).
- Winter, A. G., u. Schönbeck, Fr., Düngung und „biologischer Wert“ der
Nahrung. Hippokrates, Heft 1, S. 56-62 (1959).

Winter, A.G., u. Schönbeck, Fr., Zum Wirkstoffkreislauf Pflanze-Tier-
Boden. Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde,
84. (129) Bd.; Heft 1 - 3 (1959).

Lebenslauf

von

Dieter Säurig

Herkunft:

27.7.1930

in Dresden geboren,

Vater: Max Säurig, leit. Angestellter,

Mutter: Charlotte Säurig, geb. Müller,

Schulbildung:

1937 - 1941

Volksschule Dresden,

1941 - 1949

Staatl. Oberschule für Jungen, Dresden-Süd,

1949 - 1950

Staatl. Ausbildungslehrgang für Grundschul-
lehrer in Dresden,

Berufl. Tätigkeit

1950 - 1953

Grundschullehrer im Bezirk Dresden,

1953 - 1956

Oberschullehrer im Bezirk Dresden,

Studium

1956 - 1961

Studium der Naturwissenschaften an der
Universität München,

1958 - 1961

Promotionsarbeit am Botanischen Institut
der Universität München.

